N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 12.612

UNIVERSITE PARIS VII

THESE

pour le DOCTORAT ES SCIENCES

présentée par

Jean-Pierre FRÉNOY

ETUDE CONFORMATIONNELLE DE L'α_2 - MACROGLOBULINE HUMAINE

soutenue le 8 Juin 1976 devant la Commission d'Examen composée de

PRESIDENT — Mr Jean-Marie DUBERT

EXAMINATEURS — MM. Michel GOLDBERG, Rapporteur
Roland BOURRILLON
Harold EDELHOCH
Pierre JOLLÈS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548114_0034

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 12.612

UNIVERSITE PARIS VII

THESE

pour le DOCTORAT ES SCIENCES

présentée par

Jean-Pierre FRÉNOY

ETUDE CONFORMATIONNELLE DE L'α_2 - MACROGLOBULINE HUMAINE

soutenue le 8 Juin 1976 devant la Commission d'Examen composée de

PRESIDENT	Mr Jean-Marie DUBERT
EXAMINATEURS	MM. Michel GOLDBERG, Rapporteur
	Roland BOURRILLON
	Harold EDELHOCH
	Pierre JOLLÈS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biochimie - Centre de Recherches sur les Protéines - de la Faculté de Médecine Lariboisière - Saint-Louis (Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. n° 321) sous la direction de Monsieur le Professeur Roland BOURRILLON, qui a bien voulu m'accueillir et m'a toujours aidé, conseillé et encouragé. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le Docteur Harold EDELHOCH grâce à qui j'ai pu réaliser une partie importante de ce travail et qui, outre un accueil chaleureux, a su me témoigner à la fois son intérêt et son amitié.

Je remercie Messieurs les Professeurs Jean-Marie DUBERT, Michel GOLDBERG et Pierre JOLLÈS, qui ont bien voulu faire partie du jury, pour leur accueil et l'attention qu'ils ont portée à ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Edmond RAZAFIMAHALEO, qui a bien voulu se charger, avec patience, de ma formation lors de mon arrivée dans le laboratoire du Professeur BOURRILLON. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

J'exprime aussi toute ma reconnaissance aux chercheurs et techniciens du laboratoire qui ont contribué à faciliter mon travail.

PLAN

INTRODUCTION p. 7

MATERIEL ET METHODES p. 19

1. Origine des α_2Macroglobulines p. 21

2. Méthodes chromatographiques p. 21
   a) gel-filtration
   b) Chromatographie sur DEAE-cellulose

3. Techniques électrophorétiques p. 22
   a) Electrophorèse de zone
   b) Electrofocalisation

4. Poids moléculaire p. 24
   a) Estimation du poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide
   b) Estimation du poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS)
   c) Ultracentrifugation.

5. Techniques spectrophotométriques p. 26
   a) Dichroïsme circulaire
   b) Fluorescence - Polarisation de fluorescence

6. Techniques chimiques p. 28
   a) Dosages analytiques
   b) Dosage chromatographique des aminoacides
   c) Chromatographie des glucides en phase gazeuse
   d) Détermination des groupements terminaux
   e) Dansylation de l'α_2-MG pour polarisation de fluorescence
   f) Clivage des ponts disulfures par réduction-alkylation

7. Techniques immunologiques p. 30
   a) Immunoélectrophorèse
   b) Immunodiffusion
   c) Antisérums

8. Techniques enzymatiques p. 31
a) capacité de protection de la trypsine
b) Traitement de l'α_2-MG par la neuraminidase

9. Matériels et produits divers p. 32
a) Matériels
b) Enzymes - Protéines
c) Produits, réactifs, substrats

RESULTATS - DISCUSSION p. 33

1. PREPARATION DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - CRITERES D'HOMOGENEITE p. 35

1.1 Préparation de l'α_2-MG p. 35
1.2 Critéres d'homogénéité p. 36
1.3 Préparation d'α_2-MG individuelles p. 37

2. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES p. 43

2.1 Composition chimique des α_2-MG individuelles p. 43
2.2 Analyse de la microhétérogénéité de l'α_2-macroglobuline humaine par électrofocalisation p. 46
2.2.1 Electrofocalisation d'un pool d'α_2-MG
2.2.2 Electrofocalisation de préparations d'α_2-MG individuelles
2.2.3 Electrofocalisation de l'α_2-MG désialisée
2.2.4 Discussion

3. CARACTERISATION ET PROPRIETES PHYSIQUES DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE p. 57

3.1 Etude de l'α_2-MG à pH neutre p. 57
3.1.1 Ultracentrifugation - Poids moléculaire
3.1.2 Caractérisation de l'α_2-MG par électrophorèse en gel de polyacrylamide
3.1.3 Structure secondaire - Dichroïsme circulaire
3.1.4 Structure tertiaire - Fluorescence - Polarisation de fluorescence

3.2 Etude de la stabilité de l'α_2-Macroglobuline humaine
Effets du pH et de la température p. 72
3.2.1 Ultracentrifugation
3.2.2 Structure secondaire - Dichroïsme circulaire
3.2.3 Structure tertiaire - Fluorescence - Polarisation de fluorescence
3.2.4 Résumé des effets du pH et de la température

4. STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUS-UNITE p. 83

4.1 Dissociation de l'α_2-MG p. 83
4.1.1 Electrophorèse en gel
4.1.2 Filtration en gel
4.1.3 Fluorescence
4.1.4 Ultracentrifugation

4.2 Réduction-alkylation de l'α_2-MG p. 90

4.3 Caractérisation des fractions I et II isolées après réduction-alkylation de l'α_2-MG p. 94
4.3.1 Mobilité électrophorétique
4.3.2 Caractérisation immunologique
4.3.3 Composition chimique
4.3.4 Extrémités terminales
4.3.5 Poids moléculaire

4.4 Discussion p. 101

5. STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - RELATION ENTRE LA STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MG ET SON INTERACTION AVEC LES PROTEASES p. 105

5.1 Introduction p. 105

5.2 Structure sous-unitaire de l'α_2-MG fraîchement préparée p. 107
5.2.1 Réduction-alkylation
5.2.2 Réduction-alkylation après incubation avec la trypsine

5.3 Structure sous-unitaire des α_2-MG de liquides pleuraux p. 109
5.4 Interaction in vivo entre α_2-MG et protéases p. 111
5.5 Discussion p. 115

CONCLUSION p. 119

REFERENCES p. 125

Index alphabétique des auteurs cités p. 139

RESUME p. 147

INTRODUCTION

Le sérum humain normal contient de 3 à 5 % de glycoprotéines de coefficient de sédimentation 17-19 S. Ces macroglobulines sont de deux types : l'IgM, de mobilité électrophorétique γ et l'α_2-macroglobuline (α_2-MG) de mobilité électrophorétique α_2 (1).

L'α_2-MG mise en évidence en 1946 par COHN et al. (2) sous le nom de lipid poor euglobulin a été différemment dénommée dans la littérature : Crystalline α_2-glycoprotein (3), heat labile α_2-glycoprotein (4), séromucoïde α_2 de SCHULTZE (5), slow α_2-globulin (6) et finalement α_2-macroglobuline ou α_2-M ou α_2-MG (7). La concentration normale de cette protéine varie suivant les auteurs de 173 mg/100 ml (8) à 275 mg/100 ml de sérum (9). Sa présence, peut-être sous forme modifiée, a été rapportée dans de nombreuses sécrétions : lymphe (10), liquide céphalo-rachidien (11,12), liquide pleural (13), lait (14), sperme (15), fèces (16)...

L'α_2-macroglobuline est présente dans le sérum humain mais aussi dans celui des mammifères où elle présente des propriétés physicochimiques et biologiques semblables : boeuf (17), cheval (18,19), porc (20,21), cochon d'Inde (22), hérisson (23), souris (24). Chez le chien (25) et le lapin (26,27), une α_1-macroglobuline accompagne l'α_2-MG, les deux protéines ayant des caractéristiques voisines. Une α_1-MG est seule présente dans le sérum de rat normal (28) ; elle est accompagnée dans les conditions pathologiques (infection, brûlure, etc...) par une macroglobuline de mobilité électrophorétique α_2 maintenant dénommée α_2-Acute phase globulin ou α_2-AP (29-31).

Bien que synthétisable in vitro par les lymphocytes périphériques (32), l'α_2-MG est vraisemblablement synthétisée dans le foie comme la majorité

des protéines sériques (**33**) ; sa concentration est d'ailleurs augmentée après brûlure (**34**) parallèlement à une synthèse accrue des protéines sériques par le foie. La concentration de l'α_2-macroglobuline décroit chez l'homme avec l'âge (**8,35**) et augmente faiblement dans certaines conditions pathologiques (**36**) ; la seule augmentation nette, bien qu'encore faible, est observée dans les cas de syndrôme néphrotique (**4**). L'explication de ce résultat ne réside pas dans une augmentation spécifique de la biosynthèse de l'α_2-MG, mais plutôt dans une augmentation globale de la synthèse protéique pour compenser les pertes au niveau du filtre rénal, l'α_2-MG étant plus aisément retenue en raison de sa taille importante ; la clearance de l'α_2-macroglobuline est d'ailleurs utilisée comme témoin de l'état du filtre rénal dans les différentes néphrites (**37,38**).

Une élévation du taux d'α_2-MG chez les diabétiques (**39**), chez la femme enceinte (**36,40**) ou prenant des contraceptifs oraux (**40,41**) et une corrélation avec la concentration plasmatique du calcium pendant la lactation (**42**) peuvent faire penser à un rôle de transporteur hormonal pour la protéine. Une telle possibilité a été mise en évidence in vitro pour l'hormone somatotrope (**43**) et l'insuline (**44**), mais il ne semble pas que ces résultats aient été confirmés (**45**).

L'existence dans le plasma humain d'une protéine se combinant à la trypsine a été montrée par HAVERBACK et al.(**46**) et son identification à l'α_2-MG effectuée par MØHL et al. en 1964 (**47**). La liaison de l'α_2-MG et des protéases a été depuis beaucoup étudiée. Un article récent de BARRETT et STARKEY (**48**) constitue une revue assez générale de l'ensemble des protéases pouvant se lier à la protéine ; une très grande variété d'enzymes est recensée, non seulement celles dont le centre actif contient une sérine comme la trypsine, la plasmine (**49**), la thrombine (**50,51**), la kallikréine (**52**) et l'élastase (**53**) mais aussi des protéines à groupements actifs thiols, cathepsine B1 (**54**), papaïne (**48**), ou carboxyliques, cathepsine D (**48**) et des métalloprotéases comme la collagénase (**55**).

La combinaison enzyme-α_2-macroglobuline entraîne une inhibition partielle ou plus souvent totale de l'activité protéolytique de l'enzyme

sur les substrats de poids moléculaire élevé (fibrine, caséine) ; par contre, l'activité estérasique vis à vis des petits substrats Benzoyl-arginine - ethyl-ester (BAEE) et Benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) pour la trypsine, est maintenue (**46,47,56**) ; elle peut même être légèrement augmentée et est généralement protégée contre les inhibiteurs de poids moléculaire élevé comme l'inhibiteur trypsique du soja (**56**) mais non contre les inhibiteurs spécifiques de faible poids moléculaire comme la benzylamine (**57**).

Le nombre de molécules de protéases fixées par molécule d'α_2-MG reste très discuté : malgré un grand nombre de travaux effectués par différentes techniques, les auteurs restent partagés entre l'existence d'un rapport molaire 1 (**48,53,58-60**) ou 2 (**61-63**), ceci aussi bien pour les protéases de tous genres que pour les α-macroglobulines de toutes origines. Il ne semble pas que le chiffre de 3 molécules de trypsine par molécule d'α_2-MG bovine (**64**) ait été retrouvé et puisse être pris en considération. Les constantes d'affinité trouvées sont toujours très élevées, allant de 10^7 (**65**) à 10^{10} (**66**), il est peu vraisemblable que dans de telles conditions une libération de l'enzyme soit physiologiquement possible.

L'α_2-MG jouerait ainsi un rôle de capteur plutôt que de transporteur (**61**). Cette protéine a d'ailleurs une constante d'affinité plus élevée pour la trypsine que l'α_1-antitrypsine; elle peut ainsi déplacer la trypsine du complexe trypsine-α_1-antitrypsine (**67**).

Aussi, bien que ses variations de concentration dans les conditions pathologiques ne soient pas réellement significatives, il semble que le rôle biologique que l'on puisse affecter à l'α_2-MG, en relation avec sa liaison avec les protéases, soit la fixation et l'élimination de ces protéases libérées dans le sérum dans diverses conditions. Dans ce rôle de protection de l'organisme, l'α_2-MG serait un tampon anti-protéases. Cette hypothèse est confirmée par les expériences effectuées in vivo chez le chien (**68**), dans lesquelles le complexe α_2-MG-trypsine est rapidement éliminé de l'organisme, cette élimination étant très accélérée par rapport à celle de la macroglobuline seule. Cette expérience a été répétée avec succès chez l'homme (**69**). De plus, le complexe α-macroglobuline-protéases est chez

le lapin sélectivement capté par les macrophages alvéolaires (70).

Les activités de l'α_2-MG au niveau cellulaire sont encore difficiles à interpréter. Si l'inhibition par des injections d'α_2-MG de la croissance des tumeurs expérimentales chez le rat a été rattachée à la fixation des enzymes par la protéine (71), cette explication n'est pas définitive. Certaines propriétés, telles l'association avec les surfaces cellulaires tumorales (72) ou les cellules lymphoïdes (73), l'inhibition de la transformation des lymphocytes stimulés par la lectine de Phaseolus vulgaris (74), ou l'inhibition de l'hémagglutination virale (75, 76), une des premières propriétés décrites pour l'α_2-MG de cheval (18), peuvent raisonnablement être attribuées aux constituants glucidiques de la macroglobuline, intervenant tant à la surface cellulaire que comme inhibiteur des sites récepteurs des lectines. Dans l'état actuel des connaissances, deux séries de résultats sont encore inexpliquées: l'effet immunosuppressif de la protéine, lui permettant de prolonger la survie des greffes (77) que l'on peut vraisemblablement rapprocher des expériences d'inhibition de croissance des tumeurs, et surtout, après irradiation, l'effet stimulant de l'α_2-MG sur la régénération et le retour à la normale de la population cellulaire de la moelle osseuse (78, 79).

Si les travaux sur les propriétés biologiques de la protéine sont très nombreux, les caractéristiques physiques et chimiques de l'α_2-MG sont beaucoup moins connues. Fondées sur les propriétés de la protéine, les techniques d'isolement de l'α_2-macroglobuline, à partir du plasma ou du sérum utilisent différentes combinaisons : précipitation fractionnée par les sels neutres (3,80) électrophorèse préparative (80, 81), filtration en gel (82) ou ultracentrifugation préparative (83).

La composition chimique de l'α_2-MG est celle d'une glycoprotéine sérique comprenant environ 10% de glucides, dont deux hexoses : le mannose et le galactose ; le fucose, la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétyl-neuraminique (84). Les compositions en aminoacides de différentes préparations d'α_2-MG humaines (83, 85) et d'α_2-MG d'autres espèces (18, 21) sont très semblables. La présence de zinc, à raison de 3 à 7 atomes par molécule protéique, a été rapportée pour l'α_2-MG humaine (86), alors qu'il semble que l'α_2-MG de lapin contienne du nickel (87). Aucune relation n'a été trouvée entre la présence du métal et l'activité biologique de la protéine.

Si les études de la structure chimique par hydrolyse enzymatique de la protéine n'ont été que partielles, l'hétérogénéité des fractions glycopeptidiques obtenues par hydrolyse pronasique a permis de conclure qu'il existait environ 35 chaînons glucidiques par molécule protéique (**88,89**). La neuraminidase étant apparemment sans effets, la microhétérogénéité observée pour l'α_2-MG par des techniques immunologiques (**90**) ou par électrophorèse en gel de polyacrylamide (**59**) n'a pas été attribuée aux constituants glucidiques mais à une fixation plus ou moins importante de trypsine.

Aucune origine précise n'a été rapportée pour les huit déterminants antigéniques principaux de l'α_2-macroglobuline humaine (**91**). Il en est de même pour les allotypes de l'α_2-macroglobuline du lapin dont la génétique a été soigneusement étudiée (**92-94**). L'existence de tels allotypes a d'ailleurs été récemment démontrée par différentes techniques pour l'α_2-MG humaine (**95,96**).

Les caractéristiques physiques de l'α_2-MG humaine purifiée ont été déterminées : pHi : 5.4, $E^{1\%}_{1cm}$ = 6.9 à 280 nm, $s^0_{20\,w}$ = 19.6 S, $D^0_{20\,w}$ = 2.41 x 10^{-7} cm^2/s, rapport des coefficients de friction f/fo = 1.43, la molécule ayant la forme d'un ellipsoïde de révolution (**97**). Le poids moléculaire mesuré par diffusion de la lumière est 920 000 et par ultracentrifugation 820 000 ; ces expériences utilisaient un volume partiel spécifique $\bar{v}$ = 0.735 (**97**). Avec le même $\bar{v}$, ces valeurs ont été récemment remises en question par la technique d'équilibre de sédimentation à vitesse élevée, des chiffres de 725 000 (**98,99**) et même 650 000 (**59**) étant trouvés.

Des paramètres moléculaires analogues sont déterminés pour les α-macroglobulines animales (Tableau **I**).

En raison du poids moléculaire élevé de ces macroglobulines, il était raisonnable de penser à l'existence d'une structure sous-unitaire, mais les conceptions en sont encore spéculatives. L'observation de deux composants en électrophorèse en gel d'amidon (**80**) et de deux arcs de précipitation en immunoélectrophorèse (**21**) a été attribuée à la présence d'un constituant 11-12 S, dont l'existence, à côté de la molécule native 17-19 S, peut être montrée en ultracentrifugation (**80**). GENTOU a étudié la formation de ce constituant 11-12 S, dont l'importance quantitative dépend de la température et du pH ; il en a déduit un modèle de structure quaternaire de l'α_2-MG (**100**)

fondé sur l'existence d'un monomère P_1 11-12 S, pouvant se dimériser sous deux formes P_2^P et P_2^a suivant que les monomères sont associés par des zones d'interactions polaires ou apolaires (Fig. 1). Ces conclusions sont toutefois discutées (**98**), les expériences d'ultracentrifugation étant effectuées en milieu non tamponné.

Les expériences d'ultracentrifugation en présence d'agents dénaturants, révélaient toujours plusieurs constituants de coefficients de sédimentation inférieurs à 17 S : 7 S et 9 S dans l'urée 5 M (**97**,**101**), l'élimination de l'urée par dialyse entrainant la reformation des composés 17 S. ISLIKER (**102**) a montré que l'addition de cystéine ou de cystéamine accentue la dissociation donnant naissance à des produits 6 S et 4,5 S. Il n'était toutefois pas possible de séparer ces composants par filtration en gel dans ces milieux dénaturants.

La réduction de l'α_2-MG, suivie d'alkylation révèle en ultracentrifugatio dans l'urée 5 M deux composants de coefficient de sédimentation 2,8 S et 0.7 S, qui ne sont pas séparables par filtration en gel de Sephadex. Cependant, par l'électrophorèse en gel d'amidon dans l'urée selon POULIK (**103**), l'α_2-MG montrait 8 bandes protéiques, migrant toutes plus rapidement que l'α_2-MG native. Des résultats analogues étaient obtenus pour les α_2-MG animales (**104**) quand les produits de la réduction-alkylation n'étaient pas insolubles.

Plusieurs aminoacides N-terminaux étaient mis en évidence par dinitrophénylation de l'α_2-MG humaine (**105**,**106**) et des α-macroglobulines animales (**107**,**108**). Ces résultats apportaient un nouvel argument à la présence de plusieurs chaînes polypeptidiques dans ces macroglobulines et rendaient plus surprenante encore l'impossibilité de séparer des sous-unités de l'α_2-MG par gel-filtration en milieu dénaturant, même après réduction alkylation.

Ainsi, les propriétés physiques de l'α_2-macroglobuline sont relativement peu connues (**21**, **97**) ; aussi, une étude de la structure conformationnelle de cette protéine a-t-elle été entreprise dans le but de pouvoir ensuite comparer les propriétés de la protéine à l'état natif et combinée avec les protéases. Plusieurs arguments expérimentaux, ultracentrifugation, électrophorèse en gel,

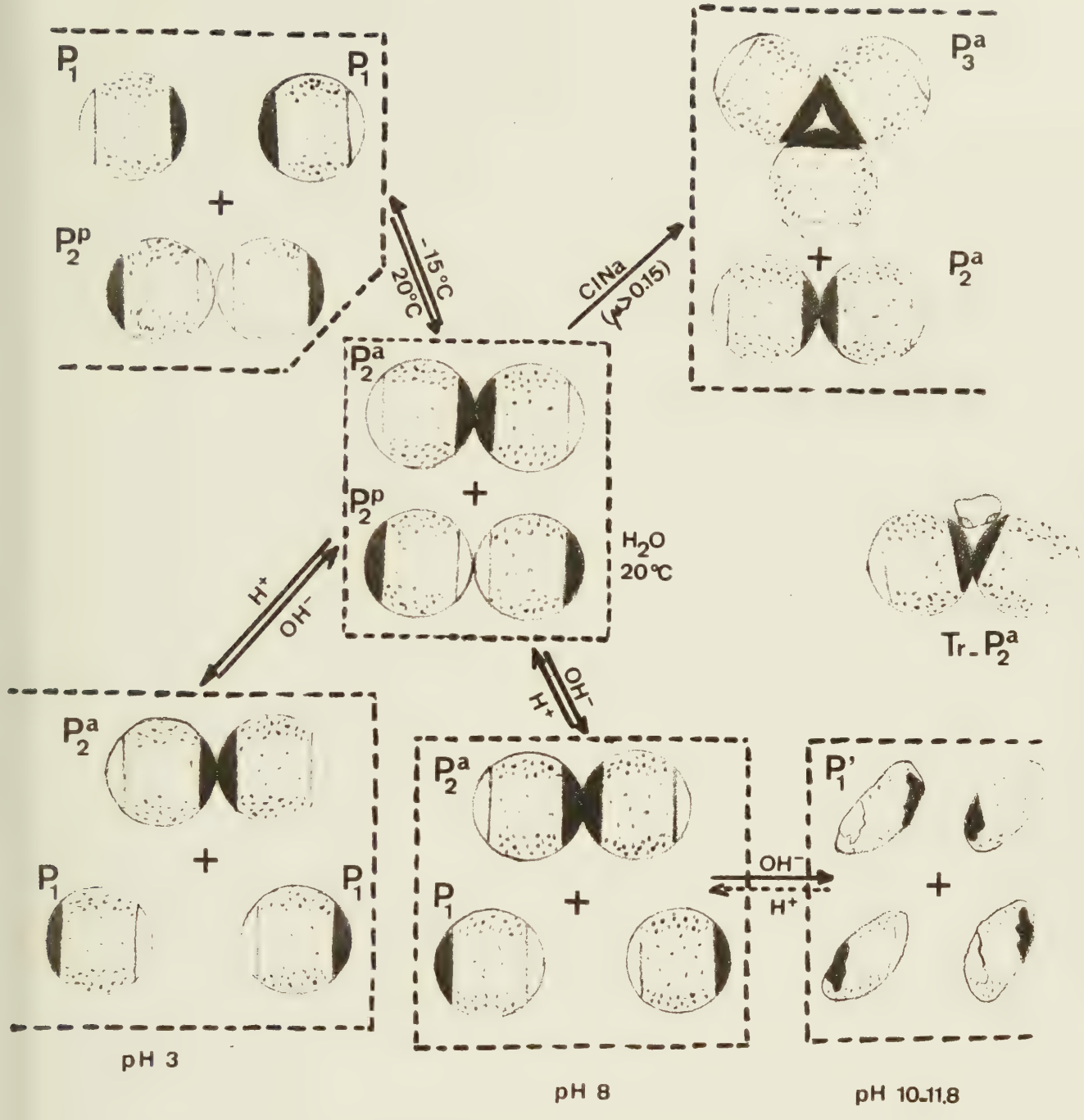
dinitrophénylation, plaidaient en faveur de la présence de sous-unités dans l'α_2-MG, mais la structure exacte de cette protéine était encore inconnue (**98,109**). L'objectif du présent travail était de préciser la structure sous-unitaire de l'α_2-macroglobuline humaine. Il est possible de déduire des résultats expérimentaux que l'α_2-MG est une glycoprotéine de poids moléculaire 780 000 (17-19 S) formée de deux demi-molécules (11-12 S) liées entre elles par des liaisons non covalentes. La demi-molécule contient deux chaînes polypeptidiques, de poids moléculaire 180 000-190 000 liées par des ponts disulfures, chacune ayant en son milieu une région spécifique particulièrement susceptible aux protéases.

Tableau I : PARAMETRES MOLECULAIRES DES α-MACROGLOBULINES

	Homme	Porc	Boeuf	Cheval	Lapin		Rat
					α_1-MG	α_2-MG	α_1-MG
$s^0_{20,w}$ (S)	19.6	18.0	17.8	18.05	16.6	20.31 19.8(**111**)	17.8 18.3 (**28**)
$D^0_{20,w}(10^{-7}cm^2/s)$	2.41	-	1.93	1.55	1.7(**111**)	2.16	-
$\bar{v}$ (ml/g)	0.735	0.720(**110**)	0.720	-	-	0.725	-
Poids moléculaire	920.000[a] 820.000[b] 725.000[c] (**98**)	960.000[a] 740.000[c](**110**)	800.000[b]	1.000 000[b]	820.000(**111**)	850.000[b] 820.000(**111**) 700.000[c](**87**)	760.000[a]
pHi	5.40	4.62 (**20**)	5.07	4.80 (**19**)	4.45 4.50 (**108**)	4.60(**111**) 5.10(**108**)	4.4
$E^{1\%}_{1cm}$ à 280 nm	6.9	10.2	10.0	12.7	7.5	8 (**111**)	8.5
	SCHONENBERGER et al. (**97**)	JACQUOT-ARMAND et GUINAND (**21**)	NAGASAWA et al. (**17**)	PEPPER (**18**)	GOT et al. (**112**)	PICARD et al. (**104**)	GAUTHIER et al. (**113**)

a - Diffusion de la lumière
b - Sédimentation-diffusion
c - Equilibre de sédimentation.

Fig. 1



Modèle de structure quaternaire de l' α_2-MG proposé par GENTOU (100).

P_1 : Monomère 11-12S.

P_2^a : Dimère associé par les zones d'interactions apolaires (■).

P_2^p : Dimère associé par les zones d'interactions polaires (□).

P_3^a : Trimère associé par les zones hydrophobes.

$Tr\text{-}P_2^a$: Dimère P_2^a (forme active) associé à la trypsine.

⁘: Zones indifférenciées.

Le rayon de la sphère est de l'ordre de 50Å.

MATERIEL
ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. ORIGINE DES α_2-MACROGLOBULINES

Les sérums et plasmas utilisés sont des pools de donneurs normaux des deux sexes provenant du C.N.T.S. (Paris) et du C.D.T.S. de Bois-Guillaume (Dr ROPARTZ) pour un pool de plasma.

Les α_2-macroglobulines humaines individuelles ont été préparées à partir de sérums aimablement fournis par le service de l'Haptoglobine (Prof. JAYLE et ENGLER) de la Faculté de Médecine de Paris.

L'α_2-MG préparée par fractionnement au rivanol selon la technique de STEINBUCH et al. (**114**) est un don de J. BIETH.

Les α_2-MG de liquides pleuraux ont été préparées selon la technique utilisée pour les α_2-macroglobulines individuelles. Une étape de filtration sur Sephadex G-200 a toutefois été ajoutée comme conseillé dans la littérature (**99**). Ces préparations ont été effectuées par T. KLUMP dans le laboratoire du Dr. J. BIETH (Prof. MÉTAIS) à Strasbourg.

2. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

a) Gel-filtration

- Sephadex G-25, G-150, G-200 (Pharmacia, Uppsala, Suède). Les gels de dextrans sont mis à gonfler, pendant 48 heures, dans le tampon choisi pour l'élution. La suspension formée est lavée et décantée plusieurs fois puis, après dégazage, coulée dans une colonne de verre.

- Sepharose 4 B, Biogel A-5m (Pharmacia, Uppsala, Suède et Biorad, Richmond, USA). Les gels d'agarose fournis en suspension sont simplement lavés plusieurs fois par le tampon d'élution dégazés et coulés en colonne.

Pour les gels faiblement réticulés, afin d'éviter un tassement, la pression de travail n'excèdera jamais 100 mm d'eau, en particulier lors de l'utilisation d'agents dénaturants (urée, guanidine) à de fortes molarités.

b) Chromatographie sur DEAE-cellulose DE 52 (Whatman, G.B.)

La poudre de DEAE (Diéthylaminoéthyl)-cellulose prégonflée est mise en suspension dans le tampon choisi à la molarité 0.2 M ; elle est lavée décantée et filtrée sur Büchner jusqu'à équilibrage du pH et de la conductivité

du filtrat, elle est enfin équilibrée dans le tampon 0.01 molaire, dégazée, puis coulée dans une colonne. La solution protéique à fractionner est avant dépôt, dialysée contre le tampon équilibrant la colonne.

L'élution est effectuée selon deux techniques :-l'élution discontinue est obtenue par des solutions de NaCl de molarité croissante, à pH 6.8 et à molarité constante en tampon.

- L'élution par gradient continu est effectuée avec l'autograd Technicon, le gradient étant linéaire en chlorure de sodium de 0 à 0.2 M dans le tampon phosphate 0.01M, pH 7.4.

3. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

a) Electrophorèses de zone

- Electrophorèse préparative sur colonne PORATH (type 5801 A, n° 060, LKB - Suède).

La colonne constituée de poudre de cellulose éthanolisée et traitée au formaldéhyde, de hauteur 65 cm, est comprise entre deux tubes coaxiaux de diamètres 6,5 et 11 cm. La solution de protéines est introduite par gravité à 10 cm de profondeur, l'électrophorèse est effectuée dans le tampon de MICHAELIS modifié, véronal-HCl 0.05 M, pH 8.6, sous une tension stabilisée de 450 V et une intensité de 400 à 650 mA. La réfrigération de la colonne est assurée intérieurement et extérieurement par l'eau courante, les produits d'électrolyse formés aux électrodes, sont neutralisés dans le flacon réservoir de tampon.

Les composants sériques de migration rapide (albumine, α_1, et α_2-globulines) sont élués à partir de la 23ème heure d'électrophorèse, celle-ci étant assurée pour une durée totale de 40 heures ; l'élution des composants de migration lente (β et γ-globulines) est ensuite poursuivie par gravité.

- Electrophorèse sur papier (Schleicher et Schüll 2043 b)

Elle est effectuée dans le tampon de MICHAELIS modifié, véronal-HCl 0.1 M, pH 8.6, sous une tension de 130 V et une intensité de 10 à 15 mA pendant 16 heures, Après séchage, les protéines sont révélées par l'amidoschwarz, (R.A.L. Kuhlman).

- Electrophorèse sur acétate de cellulose (Selecta, Schleicher et Schüll)

Elle est effectuée dans le tampon de MICHAELIS modifié, véronal-HCl 0.05 M pH 8.6, 2mA/bande pendant 90 minutes. Les protéines sont révélées par l'amido-

achwarz.

- Electrophorèse en gel d'amidon

L'électrophorèse en gel d'amidon (amidon hydrolysé Connaught) est effectuée selon la technique de SMITHIES (**6**), en tampon borate de sodium 0.03 M, pH 8.9, pour la préparation du gel et 0.3 M, pH 8.4, dans les cuves. Les protéines sont incluses dans le gel à des concentrations de 3 à 10 mg/ml; après électrophorèse 6 heures sous 230 V et 25 mA, elles sont révélées par l'amidoschwarz.

L'électrophorèse en gel d'amidon dans l'urée est effectuée selon la technique de POULIK (**103**), dans le tampon formate-NaOH 0.2 M, pH 3.3, urée 6 M. Les protéines sont incluses dans le gel à des concentrations de 3 à 10 mg/ml; soumises à l'électrophorèse pendant 7 heures sous 30 V/cm et 50 mA, puis révélées par l'amidoschwarz.

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide (système Büchler)

Les conditions d'électrophorèse en gel de polyacrylamide sont celles de RODBARD et CHRAMBACH (**115**). Photopolymérisation et électrophorèse sont effectuées à 0°C. Le système tampon multiphasique B (Tris-HCl-H_3PO_4-glycine) opératif à pH 10.2 (0°C) et le système D (bis-tris-HCl-acide cacodylique-acide N-tris-methyl-2-aminoethanesulfonate) opératif à pH 7.5 (0°C) sont utilisés. T étant la concentration totale en gel (g/100 ml) définie par % T = acrylamide + méthylène-bisacrylamide, et % C = 100 (méthylène-bis acrylamide/T) (**116**) ; les gels de concentration sont préparés à T = 3.125 % avec C = 20 % et les gels de séparation à T de 4 à 7 % avec C = 2 %.
Après électrophorèse (2 h, 2mA/gel, 20-100 µg de protéines), les gels sont colorés au bleu de Coomassie (**117**). Dans les conditions expérimentales, le bleu de bromophénol a une mobilité relative (R_f) de 1.0, permettant de calculer les R_f des différentes protéines par référence à ce colorant.

b) Electrofocalisation

- Electrofocalisation préparative

Les séparations par électrofocalisation sont effectuées selon la technique de VESTERBERG et SVENSSON (**118**) avec la colonne LKB 8102 de capacité 440 ml. Le gradient de pH d'ampholytes à 1 % est de 4-6 dans un gradient de sucrose linéaire 0-47 % ou de pH 4-7 (0.75 % ampholines 4-6, 0.75 % ampholines 5-7) dans le même gradient de sucrose. Dans toutes les expériences, la solution d'électrode inférieure contient 55 % de sucrose et 1 % H_2SO_4 et la

solution d'électrode supérieure de l'éthylénediamine à 2 %. La réfrigération étant assurée par l'eau courante, l'électrophorèse dure 48 ou 72 h sous 800 V. Le contenu de la colonne est ensuite vidé par gravité à un débit de 100 ml/h, le pH de chaque fraction étant mesuré immédiatement après collection.

- Electrofocalisation analytique en gel de polyacrylamide

Les expériences d'électrofocalisation analytique sont effectuées en gel de polyacrylamide (T = 5 %) avec un gradient de pH 4-7, à 4°C, selon la méthode de DOERR et CHRAMBACH (**119**). Après électrophorèse, les gels sont fixés dans l'acide trichloracétique, puis colorés avec du bleu de Coomassie G-250 comme décrit par RADOLA (**120**).

4. POIDS MOLECULAIRE

a) Estimation du poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide

La taille et la charge nette (valence) de l'α_2-MG sont calculées à partir de la courbe de Ferguson ("Ferguson plots") : $\log R_f = f(\%\ T)$ à l'aide du programme ordinateur décrit par RODBARD et CHRAMBACH (**115**) pour les systèmes B et D. Les courbes de protéines-standard utilisées comme référence sont celles décrites par CORVOL et al. (**116**). Le poids moléculaire de l'α_2-MG est calculé à partir du rayon moléculaire, R, défini par

$$R = \sqrt[3]{\frac{3\ P.M.\ \bar{v}}{4\ \pi\ \mathcal{N}}}$$

$\mathcal{N}$ étant le nombre d'Avogadro ; les molécules supposées sphériques, non hydratées, avec un $\bar{v} = 0.74$ (volume partiel spécifique).

b) Estimation du poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS)

- Conditions d'incubation

Les protéines, α_2-MG et témoins de poids moléculaires connus, sont incubées, à la concentration de 6 mg/ml, 4 heures à 37°C en présence de mercaptoéthanol 1 % et SDS 1 %.

Lors de l'étude en fonction des conditions d'incubation, les solutions protéiques sont incubées à 37°C, seules ou avec du mercaptoéthanol et du SDS, en présence d'azide de sodium pour éviter une contamination bactérienne. Aux temps 30 min, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h, des fractions aliquotes sont prélevées et conservées à - 40°C. Les échantillons autoincubés ou incubés avec seulement

du SDS ou du mercaptoéthanol sont réincubés 10 minutes avec le (les) réactif(s) manquant(s).

- Electrophorèse

Les électrophorèses ont été effectuées selon la technique de WEBER et OSBORN (121) appliquée aux gels en plaque dans le tampon Tris-HCl 0.05 M, SDS 0.2 %, β-mercaptoéthanol 0.1 %, pH 8.6, sous 400 V et 30 mA/gel pendant 2 heures.

Des gels en disque sont également préparés selon WEBER et OSBORN (121) mais avec 5 % d'acrylamide. Les solutions protéiques non dialysées sont additionnées du mélange : tampon, bleu de bromophénol, glycérol et mercaptoéthanol (121), puis immédiatement déposées aux sommets des gels. L'électrophorèse est effectuée à raison de 8 mA/gel pendant 6-8 heures. Après coloration, le tracé photométrique des gels est obtenu avec le densitomètre automatique Vernon Phi 5 (Paris, France) équipé d'un filtre Kodak jaune n° 9.

Le poids moléculaire des sous-unités de l' α_2-MG est obtenu par référence aux migrations des protéines témoins sur la courbe logarithmique du poids moléculaire en fonction du R_f.

c) Ultracentrifugation

Les essais d'ultracentrifugation analytique ont été réalisés dans une ultracentrifugeuse préparative Spinco L2-65B équipée d'un banc optique Schlieren, dans une ultracentrifugeuse Spinco modèle E équipée d'une optique Schlieren à la station centrale du C.N.R.S. et dans une ultracentrifugeuse Spinco modèle E équipée d'une optique d'absorption au N.I.H. (Bethesda).

Lorsque l'optique d'absorption est utilisée pour la mesure des coefficients de sédimentation, la position de la 1/2 hauteur du profil d'enregistrement est prise comme position de la frontière de sédimentation. En raison des très faibles concentrations des solutions utilisées (densités optiques 0.15-0.25), l'extrapolation à dilution infinie peut être négligée et S_{app} confondu avec s_o

Les poids moléculaires sont déterminés par équilibre de sédimentation à haute vitesse selon la méthode d'YPHANTIS (122). Avec l'optique d'absorption, les calculs sont effectués à partir de la relation :

$$P.M. = \frac{2\,R\,T}{(1-\bar{v}\rho)\,\omega^2} \times \frac{d\,\mathrm{Log}\,c}{dr^2}$$

R = Constante des gaz parfaits, T = température absolue,

$\bar{v}$ = Volume partiel spécifique, ρ = densité de la solution,

ω = vitesse angulaire, r = distance à l'axe de rotation.

$\frac{d\text{Log } c}{dr^2}$ = pente de la droite, Log concentration = f (r^2)

Avec l'optique Schlieren, les calculs sont effectués à partir de la relation :

$$P.M. = \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)\ \omega^2} \times \frac{y/r}{S}$$

y = ordonnée à chaque point considéré d'abscisse r.
S = aire délimitée par la courbe d'équilibre et l'axe des abscisses sur le cliché Schlieren pour chaque point d'abscisse r.

Avant ultracentrifugation, les protéines sont dialysées 48 heures contre le tampon d'expérience et leur concentration dosée spectrophotométriquement. Toute dilution ultérieure par le tampon est évitée si le milieu utilisé contient de la guanidine.

Le volume partiel spécifique $\bar{v}$ de la protéine est déterminé à partir des compositions en aminoacides (**109**) et en glucides (**123**) de la glycoprotéine selon les méthodes de COHN et EDSALL (**124**) et GIBBONS (**125**) respectivement.

5. TECHNIQUES SPECTROPHOTOMETRIQUES

a) Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire dans l'ultra-violet lointain ont été enregistrés, sous azote, avec le spectropolarimètre Cary 60, équipé avec une cellule Pockels et un porte-cellule thermostaté.

Une cellule avec un trajet optique de 0.2 cm est utilisée pour des concentrations protéiques de 0.14 mg/ml.

L'ellipticité moyenne par résidu $[\theta]$ est calculée par l'équation :

$$[\theta] = \frac{\theta \times 117.2}{10 \times l \times C}$$

dans laquelle θ est l'ellipticité observée, l le trajet optique en cm, C la concentration protéique en g/ml et 117.2 le poids moléculaire moyen par résidu de l'α_2-MG calculé d'après sa composition en aminoacides.

Les courbes de titration en fonction du pH sont obtenues en ajoutant, à l'aide d'une microseringue Agla, sous pH-mètre, de petites quantités d'acide ou base concentrés. En cas de nécessité, les corrections pour dilution sont effectuées.

b) Fluorescence - Polarisation de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec le fluorimètre Turner modèle 210 ou le fluorimètre Perkin-Elmer, MPF III, tous deux équipés de porte-cellules thermostatés.

Les mesures de polarisation de fluorescence sur la protéine dinitrophénylée, ont été effectuées avec un accessoire de polarisation Hitachi 018-0054 modifié (R. LIPPOLDT), pour le MPF III.

La polarisation est déterminée à partir de la relation :

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

dans laquelle $G = I_{HV}/I_{HH}$, I est l'intensité de la fluorescence, les indices se rapportant à la polarisation verticale (V) ou horizontale (H), des faisceaux d'excitation et d'émission respectivement. Le temps de relaxation ρ_h est calculé à partir de l'équation de Perrin (126).

$$\left(\frac{1}{P} + \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_o} + \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{3\tau}{\rho_h}\right)$$

ρ_h est la moyenne harmonique des temps de relaxation rotationnelle caractéristiques, la protéine étant considérée comme un ellipsoïde de révolution. P_o est la valeur limite de la polarisation quand $T/\eta = 0$ et τ la demi-vie de fluorescence.

Dans une protéine avec des degrés internes de liberté de rotation ρ_h représente une moyenne des diverses substructures dans la molécule dont les temps de relaxation rotationnelle dépendent de T/η . Il est aussi supposé qu'il y a de nombreux sites sur la protéine et que la conjugaison DNS-protéine a pour conséquence une distribution statistique du réactif fluorescent. ρ_h du complexe DNS - α_2-MG est calculé à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite $(1/P + 1/3) = f\ (T/\eta)$. Le temps de relaxation d'une sphère rigide, non hydratée est calculable à partir de l'équation :

$$\rho_o = 3\eta V/RT$$

V étant le volume moléculaire (ou hydrodynamique) et égal à P.M. x $\bar{v}$ et η la viscosité du solvant.

Des valeurs de ρ_h/ρ_o plus grandes que l'unité indiquent que la molécule a une forme moins symétrique qu'une sphère, si l'hydratation est négligeable ; les valeurs inférieures à l'unité impliquent que la molécule manque d'une rigidité complète et possède une liberté rotationnelle interne (127).

Le temps de demi- vie de fluorescence (fluorescence lifetime, excited lifetime, fluorescence decay time), τ , du composé DNS-α_2-MG est mesuré

avec l'appareil TRW (El Segundo, Californie) comme décrit par CHEN (128).

6. TECHNIQUES CHIMIQUES

a) Dosages analytiques

- Les protéines sont dosées par la méthode du biuret, au réactif cuprotartique, avec comme référence une gamme étalon de 1 à 5 mg de sérum albumine bovine. Après développement de la coloration, l'absorption est mesurée au spectrophotomètre à 530 nm.

  Pour la détermination des protéines dans les tubes collectés au cours des électrophorèses ou chromatographies, la technique plus sensible de LOWRY et al. (129) est utilisée.

- L'haptoglobine est déterminée selon la méthode peroxydasique de JAYLE (130) automatisée. Le dosage est effectué par le service de l'haptoglobine de la Faculté de Médecine de Paris.

- Les hexoses sont déterminés par la méthode à l'orcinol sulfurique de LUSTIG et LANGER (131) modifiée par WEIMER et MOSHIN (132). La référence est une gamme étalon de galactose-mannose (1/1) de 40 à 200 µg.
- Les osamines sont déterminées selon la technique à l'acétylacétone et au paradiméthyl-amidobenzaldéhyde (réactif d'Erlich) d'ELSON et MORGAN (133) après hydrolyse 4 heures par 3 N HCl à 100°C en ampoule scellée. La référence est une gamme étalon de 50 à 150 µg de chlorhydrate de glucosamine.
- Les acides sialiques totaux sont dosés par la technique à la diphénylamine de DISCHE (134) modifiée par WERNER et ODIN (135).
  Une solution étalon à 100 µg/ml d'acide sialique est utilisée.
- Les acides sialiques libres sont dosés selon la méthode à l'acide thiobarbiturique de WARREN (136).

b) Dosage chromatographique des aminoacides

Les aminoacides sont dosés en 4h 30 min, après hydrolyse de 100 µg de protéine, 16 heures à 100°C par 6 N HCl en ampoule scellée sous vide, par la technique de DÉVÉNYI (137) sur autoanalyseur Unichrom (Beckman). Les facteurs de correction sont déterminés par l'analyse d'un mélange standard comprenant 25 nmoles de chaque aminoacide.

c) Chromatographie des glucides en phase gazeuse

Les constituants glucidiques sont analysés par chromatographie de partage en phase vapeur des dérivés triméthylsilylés des O-méthylglycosides libérés

par méthanolyse chlorhydrique de 1 mg de protéine, selon CHAMBERS et CLAMP (**138**). Le mannitol est utilisé comme témoin interne (100 nM). La chromatographie est effectuée sur l'appareil Hewlett-Packard 5750 G équipé d'un intégrateur numérique L.T.T. 4204.

d) Détermination des groupements terminaux

- Groupements N-terminaux

Les groupements N-terminaux sont déterminés par la méthode de SANGER (**139**) au 2,4 dinitro-1-fluorobenzène (DNFB) sur l' α_2-macroglobuline réduite et alkylée et sur la sous-unité, dialysées au préalable 48 h contre une solution de chlorhydrate de guanidine 5 M, puis contre une solution de bicarbonate de sodium à 10 %. La réaction est effectuée pendant 4 h à 40°C, et l'hydrolyse des DNP-protéines par 6 N HCl pendant 8 h à 105°C sous vide. Après extraction éthérée, les DNP-aminoacides sont chromatographiés sur papier Schleicher et Schüll 2043 b dans le solvant phénol/alcool isoamylique/eau (1:1:1) pendant 30 h. Les taches des DNP-aminoacides sont découpées sur la feuille et éluées par l'eau distillée.
Pour une identification précise, les DNP-aminoacides sont rechromatographiés dans le phosphate de sodium 1.5 M, pH. 6.0. Leurs concentrations respectives sont déterminées selon SPIRO (**140**).
Les résultats qualitatifs sont confirmés par dansylation selon HARTLEY (**141**).

- Groupements C-terminaux

Chaque essai porte sur 7 à 8 mg de protéine soumis à l'action de la carboxypeptidase A-DFP dans le tampon bicarbonate de sodium 0.2 M. La réaction arrêtée par acidification, la protéine est précipitée par l'éthanol à 50 %; le surnageant contenant les aminoacides libérés est évaporé à sec, repris et déposé sur l'analyseur automatique d'aminoacides.

e) Dansylation de l' α_2-MG pour polarisation de fluorescence

La dansylation de la protéine est effectuée selon la technique décrite par BURGER et al.(**142**). Un petit volume de chlorure de 1-diméthylamino-naphtalène-5-sulfonyl(DNS), dissous dans l'acétone, est ajouté lentement à une solution d' α_2-MG dans le bicarbonate de sodium, pH 8.3, à 25°C pour donner des rapports DNS/Protéine de 1.5 et 0.5 %. La protéine conjuguée est séparée du DNS libre par filtration sur Sephadex G-25 (30 x 1 cm). Aucune précipitation de matériel protéique n'est observée au cours de la réaction.

f) Clivage des ponts disulfures par réduction-alkylation

A une solution protéique de concentration 10 à 20 mg/ml dans le tampon Tris-HCl 0.3 M, pH 8.3, urée 8 M ou chlorhydrate de guanidine 5.2 M, barbotant sous azote, est ajouté l'agent réducteur, dithiothréitol ou mercaptoéthanol, à la molarité choisie ; le flacon soigneusement bouché est mis à l'étuve à 37°C. Après 4 heures, l'alkylation est effectuée à 0°C par l'iodoacétamide en maintenant le pH à 8.3 par addition de quelques gouttes d'une solution de Tris 1 M.

7. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

a) Immunoélectrophorèse

Les immunoélectrophorèses sont effectuées suivant la technique d'HIRSCHF (**143**) sur gel d'agarose à 1.5 %. Après préparation de lames et dépôt des protéines à tester, l'électrophorèse est effectuée dans le tampon véronal sodique 0.045 M, pH 8.6, à raison de 50 V/lame durant 75 minutes.
L'antisérum déposé sur la lame; la diffusion s'effectue pendant 24 heures en chambre humide, les protéines non précipitées pendant cette période sont éliminées par lavages au sérum physiologique, puis à l'eau distillée. Les lames sont séchées puis colorées à l'amidoschwarz.

b) Immunodiffusion

Les immunodiffusions sont réalisées suivant la technique d'OUCHTERLONY (**144**) adaptée sur lame porte-objets.
Les produits déposés, une diffusion de 40 heures est effectuée en chambre humide ; lavages, séchage et révélation se poursuivent comme pour l'immunoélectrophorèse.

c) Antisérums

Le sérum de lapin anti α_2-Macroglobuline humaine est préparé par injectio de 100 µg de protéines à un lapin.

Les injections sont faites dans les coussinets plantaires pendant 3 jours consécutifs, après adjonction d'un volume égal d'adjuvant complet de Freund (Difco) à la solution. Après 15 jours, une saignée d'essai permet de tester l'antisérum en immunoélectrophorèse, celle-ci révélant la présence d'anticorps le sang est prélevé immédiatement après canulation de la carotide. Le sérum surnageant après coagulation et centrifugation douce est conservé sous antiseptique à +4°C ou congelé à - 20°C.

Le sérum équin anti-sérum humain provient de l'Institut Pasteur, lot n° 742.

8. TECHNIQUES ENZYMATIQUES

a) Capacité de protection de la trypsine

Le test d'activité biologique de l'α_2-MG a été effectuée selon la technique de GANROT (145) modifiée.

	Essai	T1	T2	T3	T4
Prise d'essai	0,25 ml	-	-	-	-
véronal-HCl 0,05 M pH 8,6	-	0,25 ml	0,25 ml	-	-
Sérum dilué au 1/25	-	-	-	0,25 ml	0,25 ml
STI (0,1 mg/ml eau)	0,20 ml	0,20 ml	-	0,20 ml	-
Eau	-	-	0,20 ml	-	0,20 ml
Tris-HCl 0,1M pH 8,2	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Trypsine (0,1 mg/ml Tris 0,1 M pH 8,2 + CaCl2 0,02 M)	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
	15 minutes à 25°C				
BAPNA (1.5×10^{-3} M)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
	Incubation 20 minutes à 25°C				
CH3COOH 60 %	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
	Lecture de la densité optique à 410 nm				

Une solution contenant de l'α_2-MG est incubée avec de la trypsine en présence d'inhibiteur trypsique de soja (S.T.I.). La trypsine fixée par l'α_2-MG n'est plus inhibée et hydrolyse le Benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) libérant de la nitroaniline jaune qui est alors dosée à 410 nm après arrêt de la réaction. Quatre témoins (T1, T2, T3, T4) sont préparés et traités dans les mêmes conditions.

b) Traitement de l'α_2-MG par la neuraminidase

Une quantité suffisante de neuraminidase (Sigma, type VI, purifiée à partir de Clostridium perfringens) est utilisée pour donner un rapport

de 30 munités d'énzyme par mg d' α_2-MG. Le traitement enzymatique est effectué à 37°C dans l'acétate de sodium 0.1 M, pH 5.0, en présence d'azide de sodium. Après 24 heures, l'acide sialique libéré est éliminé par une dialyse prolongée contre le tampon. Le mélange protéine-enzyme est réincubé 16 heures à 37°C, puis dialysé à 4°C contre de l'eau distillée.

9. MATERIELS ET PRODUITS DIVERS

a) Matériels

- pH mètre : Radiometer 25
- Résistivimètre : Heito
- Centrifugeuse : Sorvall R C 2 B
- Spectrophotomètre : Jobin et Yvon, type Maroc
- Collecteurs de fractions : Seive, Isco, Gilson
- Cuves pour électrophorèse : Apelab
- Tubes à dialyses : Visking Tubing

b) Enzymes-Protéines

Trypsine 1 fois cristallisée et trypsine-TPCK - Worthington (New-Jersey, USA) L'inhibiteur trypsique de soja, l'albumine bovine, la carboxypeptidase A sont des produits Sigma (Saint Louis, USA). L'hémoglobine, les γ globulines et la transferrine (**146**) ont été préparées dans le laboratoire.

c) Produits, réactifs, substrats

- chlorhydrate de guanidine : BDH (G.B), Fluka et Heico "Synthesized Extreme Purity" pour la fluorescence
- BAPNA (benzoyl-arginine p-nitroanilide) Sigma (Saint Louis U.S.A)
- Dithiothréitol, mercaptoéthanol, iodoacétamide : Calbiochem (Los Angeles, U.S.A)
- DNFB (2,4-dinitro, 1 fluorobenzène), acrylamide, méthylène bisacrylamide, tétraméthyl-éthylène diamine : Eastman (New York, U.S.A.)
- Chlorure de dansyl, Folin-Ciocalteu, ninhydrine : BDH (G.B)

Dodecyl sulfate de sodium (SDS), sulfate de dextran, Tris.... sont des produits Touzart et Matignon (France)

Ethanol, sulfate d'ammonium et réactifs de dosage sont des produits Merck (Allemagne).

Les autres produits sont de qualité R.P. fournis par Prolabo (France).

RESULTATS
DISCUSSION

1. PREPARATION DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - CRITERES D'HOMOGENEITE

1.1 - PREPARATION DE L'α_2-MG

L'α_2-MG est préparée à partir du sérum ou du plasma en trois étapes (Fig. 2) selon une modification de la technique de RAZAFIMAHALEO et BOURRILLON (80).

a) Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium

Après dialyse contre de l'eau distillée et centrifugation pour éliminer la majeure partie des euglobulines (IgM), le sérum est additionné d'hémoglobine en quantité calculée pour complexer la totalité de l'haptoglobine dont la zone de précipitation par le sulfate d'ammonium est alors déplacée au-delà de la molarité 2M. La précipitation effectuée à pH 6 entre 1.6 et 1.92 M (entre 40 et 48 % de saturation) permet d'éliminer l'essentiel des γ-globulines et de l'albumine, ainsi qu'une quantité importante d'α_1 et β globulines.

Le précipité repris par l'eau distillée est dialysé contre le tampon de MICHAELIS modifié.

b) Electrophorèse préparative sur cellulose

Réalisée sur colonne PORATH, elle permet de traiter en une fois la fraction du précipité correspondant à un litre de sérum ou de plasma. Un pic α_2 est obtenu (Fig. 3) ; albumine et γ-globulines contaminantes sont ainsi éliminées.

c) Filtration sur gel de Sephadex G-200

Après concentration de la fraction précédente par ultrafiltration, la filtration est effectuée en tampon phosphate de sodium mono/disodique 0.05M, pH 8.6. L'α_2-macroglobuline, exclue du Sephadex G-200 est séparée des autres α_2-globulines qui sont plus ou moins retardées.

L'identification de l'α_2-MG dans le premier pic est obtenue en électrophorèse en gel de polyacrylamide et en immunoélectrophorèse. A partir du sérum, certaines préparations d'α_2-MG apparaissent troubles en raison de la présence de lipoprotéines. Celles-ci sont éliminées par passage sur DEAE cellulose (147) en tampon phosphate de sodium mono/disodique 0.01 M, pH 6.8 ; l'α_2-MG est éluée à la molarité 0.08 M en NaCl alors que les lipoprotéines sont éluées à 0.5 M en NaCl, cette dernière fraction, très pigmentée, ne contient d'ailleurs que très peu de protéines. Toutefois, il est préférable d'éviter cette étape supplémentaire, en particulier pour

une étude des constituants glucidiques de la protéine, l'effet désialisant de la DEAE cellulose ayant été rapporté (**123**).

Afin d'éviter d'éventuelles altérations de la protéine au cours de certaines phases de la préparation et plus spécialement une protéolyse de l' α_2-MG par des protéases présentes dans le sérum ou le plasma, toutes les étapes de la préparation sont effectuées à + 4°C. De plus, particulièreme pour le plasma, les différents produits intermédiaires sont maintenus constamment en présence d'un antithrombine, l'héparine et d'un antiplasmine, l'acide aminocaproïque (hemocaprol) ; les deux inhibiteurs sont maintenus en quantité suffisante pour neutraliser toute activation des enzymes.

1-2 CRITERES D'HOMOGENEITE

L' α_2-MG ainsi préparée s'avère homogène à différents critères de pureté.

a) Electrophorèse en gel d'amidon et en gel de polyacrylamide (Fig. **2a**)
La préparation présente une bande protéique principale correspondant à la position de l' α_2-MG sérique, une seconde bande plus lente et beaucoup plus discrète est généralement observée. Sa présence a déjà été rapportée (**80 , 97**).

b) Immunoélectrophorèse - Immunodiffusion (Fig. **2b**)
Un seul arc de précipitation est révélé par un sérum antisérum humain total; en immunodiffusion, son identité immunologique est totale avec l'arc de précipitation obtenu contre un sérum monospécifique anti α_2-MG.

c) Ultracentrifugation (Fig. **2c**)
Les préparations étudiées en ultracentrifugation présentent un pic symétrique de coefficient de sédimentation 17-19 S à des concentrations de 5-10 mg/ml. Sur le cliché présenté, dans le tampon phosphate mono/disodique 0.05 M, NaCl 0.1 M, pH 6, $S_{20,W}$ = 17.28 S à 7.3 mg/ml. Le faible pourcentage (3.9 %) d'un constituant de coefficient de sédimentation plus élevé, 26.34S, ne corres pond pas à une impureté mais à un aggrégat de l' α_2-MG comme celà a déjà été signalé (**83,148**).
A partir d'un litre de sérum ou de plasma, il est possible de préparer ainsi de 500 à 600 mg d' α_2-MG, ce qui, sur la base d'une concentration moyenne de 2 g/l, correspond à un rendement de 25-30 %. Ce rendement est explicable par les pertes au cours de l'électrophorèse préparative, toujours délicate.

La macroglobuline est conservée à + 4°C sous antiseptique ou de préférence congelée à - 20 ou - 40°C, car elle apparaît dénaturée par lyophilisatio

ou conservation entre 0 et - 10°C.

1-3 PREPARATION D'α_2-MG INDIVIDUELLES

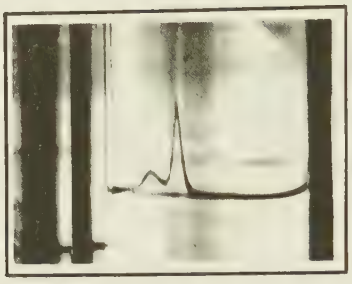
En raison de la très grande labilité de l'activité biologique de l'α_2-MG rapportée dans la littérature (**149**), il a paru intéressant de mettre au point une méthode de préparation rapide de cette protéine à partir de petits volumes de sérum, permettant, de plus, de déceler d'éventuelles différences physicochimiques entre les molécules d'α_2-MG pathologiques ou non. Le Sephadex G-200, à la limite d'exclusion trop faible (P.M. 300 000 - 500 000) ne permet pas de séparer l'α_2-MG de complexes de poids moléculaire élevés, tels ceux formés par les variants génétiques 2-2 de l'haptoglobine ; en conséquence, les gels d'agarose commerciaux en forme de perle ont été utilisés.

Les premiers essais furent effectués avec des gels à 4 % d'agarose (Sepharose 4 B) ; l'IgM était séparée du sérum par 48 heures de dialyse contre 100 volumes d'eau distillée et le précipité formé éliminé par centrifugation ; 1 à 2 ml de sérum dialysé étaient ensuite déposés sur une colonne de Sepharose 4 B (110 x 1.5 cm) dans le tampon phosphate de sodium mono/disodique 0.05 M, NaCl 0.1 M, pH 6. Dans ces conditions, l'α_2-MG obtenue, entièrement séparée de l'haptoglobine, se révélait homogène en gel d'amidon. Toutefois en immunoélectrophorèse un léger arc de précipitation est observable dans la zone β, vraisemblablement dû à la présence de lipoprotéines de haut poids moléculaire. C'est pourquoi avant d'éliminer l'IgM, les α et β-lipoprotéines sont précipitées par la méthode au sulfate de dextran en présence de chlorure de manganèse selon BURSTEIN et MORFIN (**150**). L'IgM précipite au cours des différentes dialyses permettant l'élimination du chlorure de manganèse en excès.

Une meilleure résolution peut être obtenue en utilisant un gel à 6 % d'agarose, le Biogel A-5m équilibré dans le tampon véronal-HCl 0.05M, pH 8.6. L'α_2-MG est repérée sur les différentes fractions éluées de la colonne, par la mesure de la capacité de protection de la trypsine vis-à-vis de l'inhibiteur de soja (Fig. **4**).

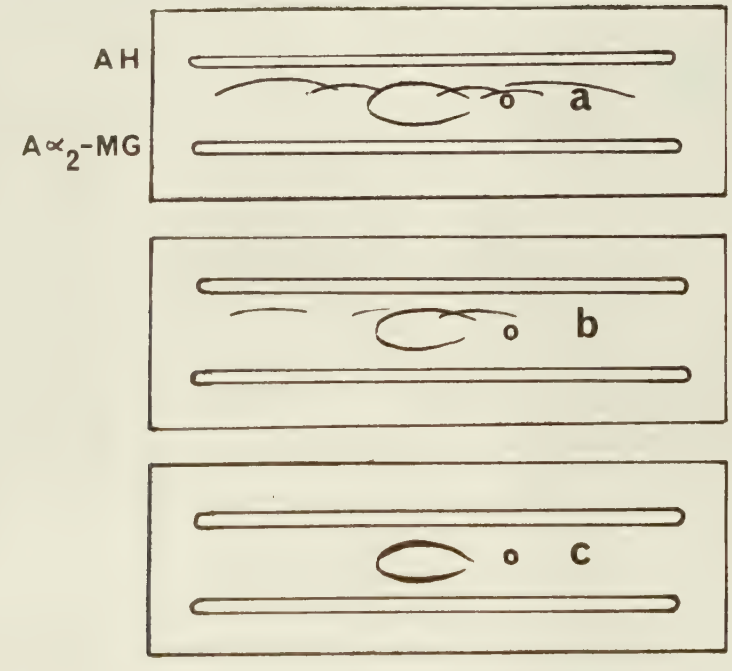
Jusqu'à 20 ml de sérum sont ainsi traités en une seule opération fournissant une α_2-MG biologiquement active, homogène en électrophorèse sur acétate de cellulose, en gel d'acrylamide et en immunoélectrophorèse, avec un rendement supérieur à 60 %.

L'ultracentrifugation, dans le tampon ci-dessus, révèle les 2 constituant 11S et 17S.



Dans certaines préparations, il a été observé deux pics d'activité protectrice de la trypsine correspondant au pic protéique. Ce fait est à rapprocher de l'observation par GANROT (**145**) lors de la filtration du sérum entier sur Sephadex G-200 de deux bandes moléculaires d' α_2 -globulines à activité antitrypsique. De telles observations suggèrent que l'activité de fixation des protéases par l' α_2-MG peut être liée aussi bien au monomère 11-12 S qu'au dimère 17-19 S, comme a été récemment observée l'interaction avec la kallikréine de monomères obtenus après traitement par l'urée 3 M (**151**).

Fig. 2 a,b



Préparation de l'α_2-Macroglobuline humaine

2a - Electrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 10.2
2b - Immunoélectrophorèse, AH = antisérum humain total
Aα$_2$-MG = sérum de lapin anti α_2-MG
2c - Ultracentrifugation

S = sérum
a = fraction précipitée au sulfate d'ammonium entre 40 et 48% de saturation
b = fraction α_2 après électrophorèse sur colonne Porath
c = α_2-MG après filtration sur Sephadex G-200.

C. N. R. S.
STATION CENTRALE D'ULTRACENTRIFUGATION
13, Rue Pierre Curie, Paris 5e

Date..... : 26 OCTOBRE 1970
Demandeur : Monsieur le Professeur BOURRILLON - Section 2
FACULTE DE MEDECINE - 45, rue des St-Pères - PARIS VIème

COMPTE-RENDU D'ESSAI à l'attention de Monsieur FRENOY.

Substance... : α_2 M

Concentration : 7,3 mg/ml (1) Δn : $\times 10^{-3}$

Tampon ..... : phosphate mono/disodique 0,05M
NaCl 0,1M d=1,0086

pH du tampon : 6

Vitesse de régime, t/min. ..... : 50 740
Durée du démarrage, en min. et sec.... : 11'
Inclinaison de la barre ..... : 60
Temps de pose (négatif photo.) en sec.. : 12"
Température d'expérience ..... : 21°10
Epaisseur de la cellule, en mm ..... : 12mmα=2, DS

Vitesses de sédimentation (à la température indiquée), en unités Svedberg :

à 20° $s_1 = 17,28$ (96,10%) $s_2 = 26,34$ (3,90%) $s_3 =$ $s_4 =$ $s_5 =$

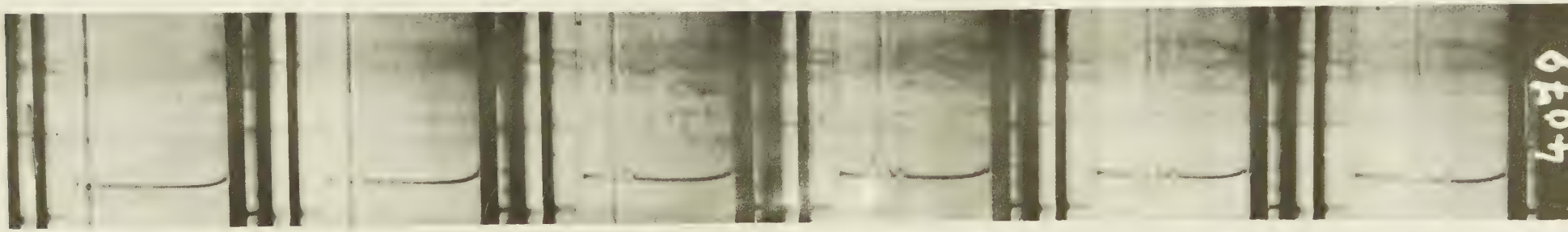
INTERPRÉTATION :

Deux constituants apparents. Les coefficients de sédimentation à 20°C et les concentrations relatives exprimées en pour cent, sont indiqués ci-dessus.

(1) Δn = Différence entre les indices de réfraction du tampon (ou solvant) et de la solution à la concentration indiquée.

Temps compté, à partir du moment d'obtention de la vitesse de régime, en minutes :

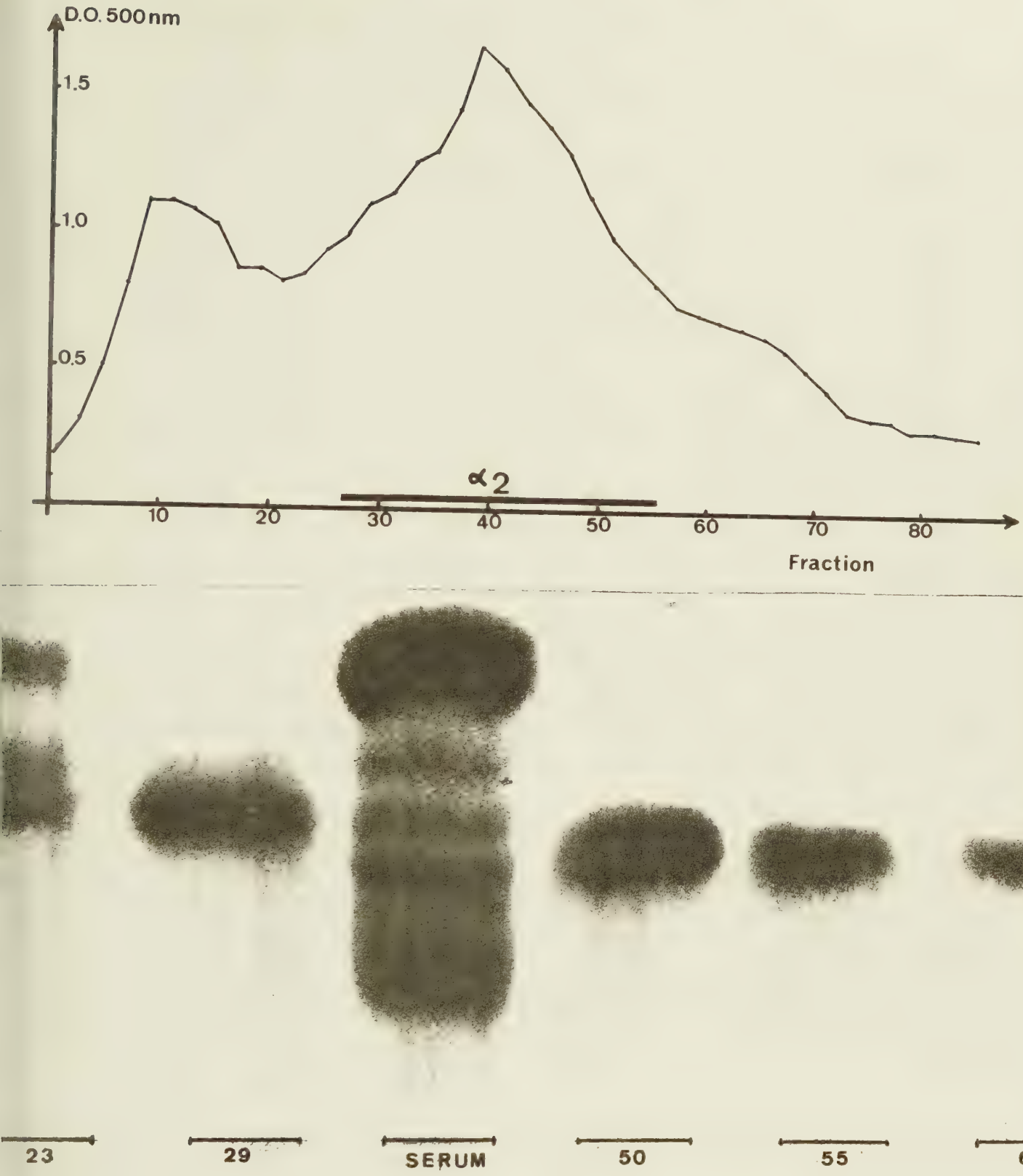
Temps:	2'	6'	10'	14'	18'	22'
Barre:	60	60	60	60	60	60



Cliché photographique N° 4079 Référence N° Bon N° 4 8 of

Fig. 2c

Fig. 3

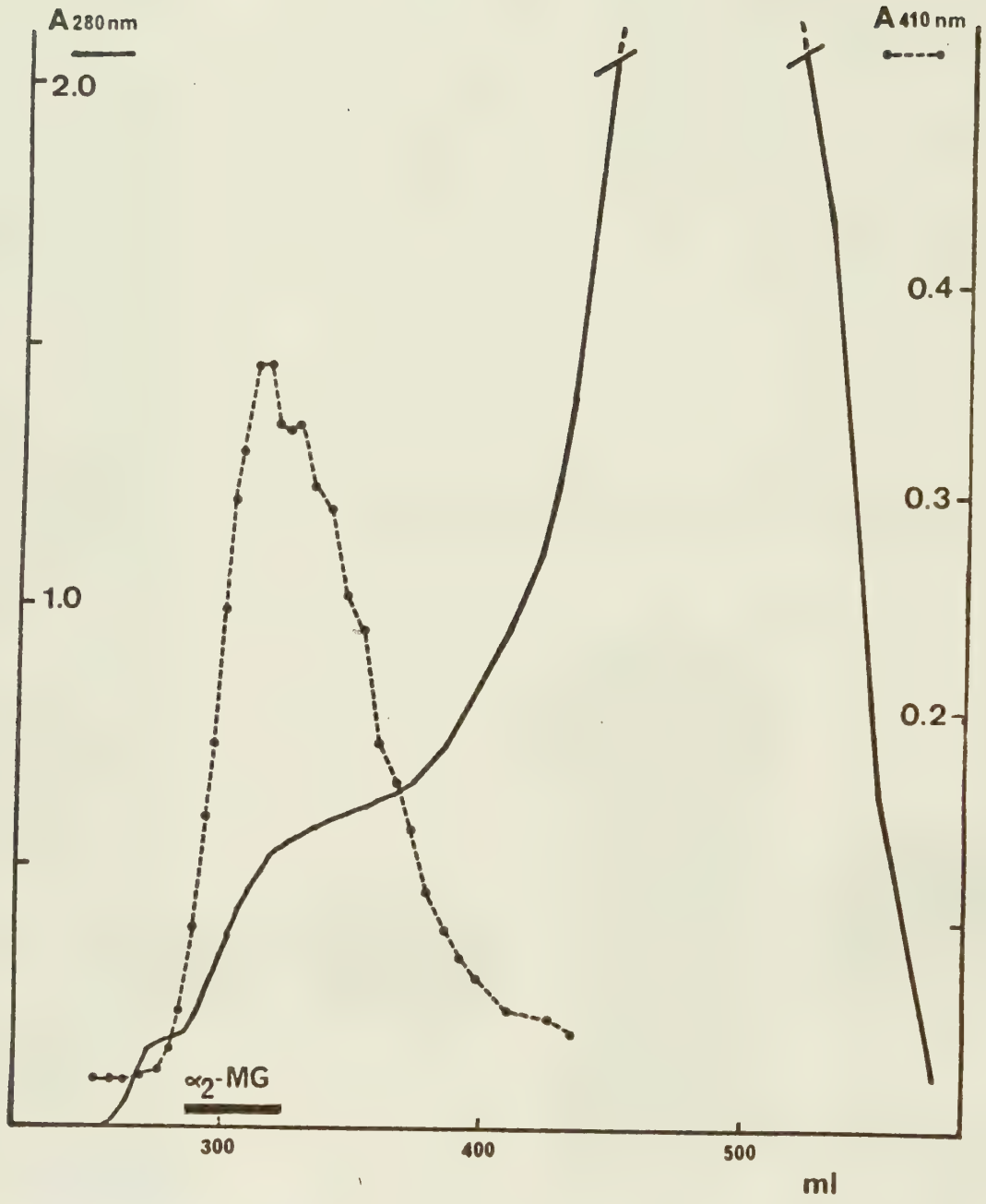


Electrophorèse sur colonne Porath de la fraction précipitée entre 40 et 48% de sulfate d'ammonium (8 g de protéines à partir de 1 l de sérum).

Tampon véronal-HCl 0.05M, pH 8.6, 450 V, 450 mA, 40 heures ; des volumes de 40 ml sont recueillis.
La courbe représente la densité optique à 500 nm(dosage de Lowry).

Electrophorèse sur papier du contenu de certains tubes.

Fig.4



Préparation d'α_2-MG humaine individuelle.

Filtration sur colonne de Biogel A-5m (100 x 3 cm), tampon véronal-HCl-0.05M, pH 8.6 de 15 ml de sérum préalablement débarrassés des lipoprotéines et de l'IgM.

A 280 nm : repérage des protéines
A 410 nm : capacité de protection de la trypsine
(T1 = 0.04, T2 = 1.05, T3 = 0.125, T4 = 0.57).

2. CARACTERISATIONS CHIMIQUES DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE

2.1. COMPOSITION CHIMIQUE DES α_2-MG INDIVIDUELLES

Certaines affections pathologiques, de type inflammatoire s'accompagnent de modifications rapides et importantes du taux des α_1 et α_2-glycoprotéines plasmatiques, tels l'orosomucoïde, l'haptoglobine, l'α_2-macroglobuline (**152**). De plus, une élévation du pourcentage en acide sialique de l'α_1-MG du lapin, est observée au cours de la réaction inflammatoire, les autres glucides de la macroglobuline n'étant pas modifiés (**153**).

Afin de pouvoir déceler d'éventuelles variations physico-chimiques entre différentes α_2-macroglobulines individuelles, les α_2-MG d'individus normaux ou atteints de différentes affections (lymphogranulomatose maligne, infarctus du myocarde ...), préparées selon la technique rapportée au § 1.3, ont été analysées pour leurs aminoacides et leurs glucides. Les sérums utilisés avaient des indices d'haptoglobine élevés indiquant une réaction inflammatoire.

Les compositions en aminoacides des différentes préparations (Tableau II) sont très semblables entre elles et se rapprochent de celle d'un pool de sérums normaux utilisé comme référence (**109**) et des résultats publiés dans la littérature (**83,85**). La partie polypeptidique étant codée, il était peu probable qu'il existe des différences entre protéines normales et pathologiques.

En ce qui concerne les constituants glucidiques des différences semblent exister au niveau des hexoses et des hexosamines, alors que les contenus en acide N-acétyl neuraminique ne sont pas essentiellement modifiés. Ces variations sont sans relation avec le caractère inflammatoire.

Dans tous les cas ces valeurs sont voisines des pourcentages en glucides des différentes fractions observées par électrofocalisation (cf. Tableau III), et il n'est pas possible de différencier immunologiquement les préparations.

L'identité entre deux protéines homologues, normale et pathologique, a été rarement étudiée ; la partie glucidique pourrait être modifiée en raison de changements de l'état cellulaire ou de la topographie des glycosyl-transférases. Une étude de l'orosomucoïde (**154**) a montré que pour cette protéine le pourcentage d'acide N-acétylneuraminique (normal 11 %) était très abaissé chez le diabétique (6.3 %) et les patients atteints d'arthrite

psoriasique (8.3 %) et de la maladie d'Hodgkin. Les résultats obtenus ne font pas apparaître de différences significatives dans les compositions des α_2-MG de sujets normaux ou pathologiques ; en particulier, il n'est pas observé de différences essentielles dans les valeurs de l'acide sialique.

Tableau II

COMPOSITION EN AMINO ACIDES ET EN CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DE L' α_2-MG HUMAINE ISOLEE D'UN MELANGE DE SERUMS ET D' α_2-MG HUMAINES INDIVIDUELLES (expression en g/100 g de protéines).

	Pool	GRA	FRE	KER	LAC	MIN	WEN	FON
Acide aspartique	7.58	7.83	7.29	7.26	7.56	7.78	7.62	7.86
Thréonine	5.59	5.58	6.03	5.35	5	5.4	4.9	5.94
Sérine	5.94	5.70	6.4	5.9	5.92	5.4	5.24	5.82
Acide glutamique	13.45	13.4	13.02	13.33	13.07	13.68	13.07	13.68
Proline	3.84	3.78	4.5	3.94	3.9	3.82	4.05	4.5
Glycine	2.87	2.96	2.96	2.9	2.99	3.44	3.1	3.08
Alanine	3.51	3.36	3.44	3.62	3.83	4.6	3.76	3.6
Valine	6.17	7.16	7.1	6.93	6.72	7	6.43	7.38
Isoleucine	3.12	3.38	3	3.52	3.17	3.65	3.02	3.44
Leucine	7.66	7.4	7.6	8.3	7.83	7.2	7.41	7.6
Tyrosine	5.02	4.8	4.67	4.38	4.24	4.16	4.53	4.94
Phénylalanine	4.81	4.84	4.84	5.01	5.01	4.95	4.36	5.33
Lysine	5.48	6.2	5.7	5.68	6.8	5.5	6.05	5.67
Histidine	2.89	2.79	2.86	2.64	3.02	2.75	2.67	3.06
Arginine	3.68	3.6	3.9	4	4.08	4.88	3.52	3.85
Méthionine	1.66	1.4	1.3	1.59		1.54	1.32	1.43
Cystéine	2.17	1.51		1.44		1.43		2.03
Glucosamine	4.25	4.35	4.9	4.1	3.53	3.21	3.96	4.95
Hexoses	4.6	5.1	4.9	5.3	4.1	5.2	4.3	5
Acide sialique	1.7	2.3	1.85	2	1.7	1.8	1.6	1.7

2.2 ANALYSE DE LA MICROHETEROGENEITE DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE PAR ELECTROFOCALISATION

Plusieurs auteurs ont, par des méthodes analytiques, démontré la microhétérogénéité de l'α_2-macroglobuline humaine (**90, 91**). SAUNDERS et al.ont signalé que cette microhétérogénéité est probablement due à l'interaction de l' α_2-MG avec les protéases (**91**).

La focalisation isoélectrique (isoelectric focusing) est une méthode très généralement utilisée pour la mise en évidence de la microhétérogénéité des protéines; elle a de plus l'avantage de pouvoir être préparative et ainsi de permettre la caractérisation des fractions observées.

2.2.1 ELECTROFOCALISATION D'UN POOL D' α_2-MG

Les résultats de l'électrofocalisation de l' α_2-MG du sérum humain sont montrés dans la Fig. **5** . Quatre pics sont mis en évidence accompagnés de quelques constituants secondaires. Les points isoélectriques des quatre pics A, B, C, D ainsi déterminés sont respectivement 4.97 ± 0.02, 5.12 ± 0.02, 5.30 ± 0.02 (composant principal) et 5.50 ± 0.02. Les contenus des tubes correspondant à chaque fraction sont groupés, concentrés par ultrafiltration et débarrassés des ampholines et du sucrose par filtration sur Sephadex G-25 (**155**).

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 6 % des quatre pics (Fig. **6a**) montrent dans chaque cas la bande principale d' α_2-MG, associée avec la seconde bande mineure correspondant au dimère de la molécule(§ 3.1.2). De plus les quatre fractions ne contiennent que de l' α_2-MG comme révélé par immunoélectrophorèse contre un antisérum équin anti plasma protéines humaines (Fig. **6b**).

Afin de tester l'homogénéité isoélectrique de ces différentes formes moléculaires de l' α_2-MG, les fractions isolées sont électrofocalisées de nouveau en gel de polyacrylamide dans une gamme de pH 4-7. Pour chaque échantillon une seule bande protéique étroite est observée après coloration.

Les compositions en aminoacides des fractions A, B, C et D ne diffèrent pas significativement, alors que des divergences sont observées dans leur composition glucidique (Tableau III).

Un abaissement de la concentration en acide sialique est observé, parallèlement à l'augmentation du point isoélectrique des différentes fractions. De la même manière le rapport mannose/galactose augmente en

même temps que le pHi.

Une chromatographie sur DEAE cellulose avec un gradient salin linéaire ne permet pas de séparer les différentes formes moléculaires de l'α_2-macroglobuline (Fig. 7). Il faut remarquer que l'électrofocalisation dans un gradient de pH 4-6 de l' α_2-MG éluée de la colonne de DEAE cellulose donne un profil nettement différent de ce qui est obtenu avant passage sur l'échangeur. Un grand nombre de composants sont observés avec un déplacement net du point isoélectrique moyen de 5.30 à 5.45, des points isoélectriques de 5.80 étant même observés (Fig. 7).

L'hétérogénéité de l' α_2-macroglobuline humaine, révélée par focalisation isoélectrique, a été également démontrée pour une α_2-MG purifiée à partir du plasma selon une autre technique, la précipitation fractionnée au rivanol. Cette préparation présente un constituant majeur de point isoélectrique 5.26 et des constituants mineurs de pHi 4.82 et 5.49.

2.2.2. ELECTROFOCALISATION DE PREPARATIONS D' α_2-MG INDIVIDUELLES

Les résultats du paragraphe précédent ayant été observés sur des α_2-MG isolées à partir d'un pool de sérum ou de plasma, il était intéressant de savoir si les mêmes profils de focalisation étaient retrouvés sur des préparations d' α_2-MG provenant d'un seul individu.

La microhétérogénéité est là aussi observée, les points isoélectriques de deux protéines purifiées à partir de sérums individuels d'homme et de femme sont voisins de 5.30 avec des pHi mineurs autour de 4.90 et 5.50 (Tableau IV).

Si la microhétérogénéité observée est bien due aux constituants glucidiques, ce résultat n'est pas surprenant ; les glucides sont en effet transférés séquentiellement sur la protéine par une action enzymatique et l'activité de ces glycosyl-transférases peut varier dans les cellules d'un même individu.

2.2.3. ELECTROFOCALISATION DE L' α_2-MG DESIALISEE

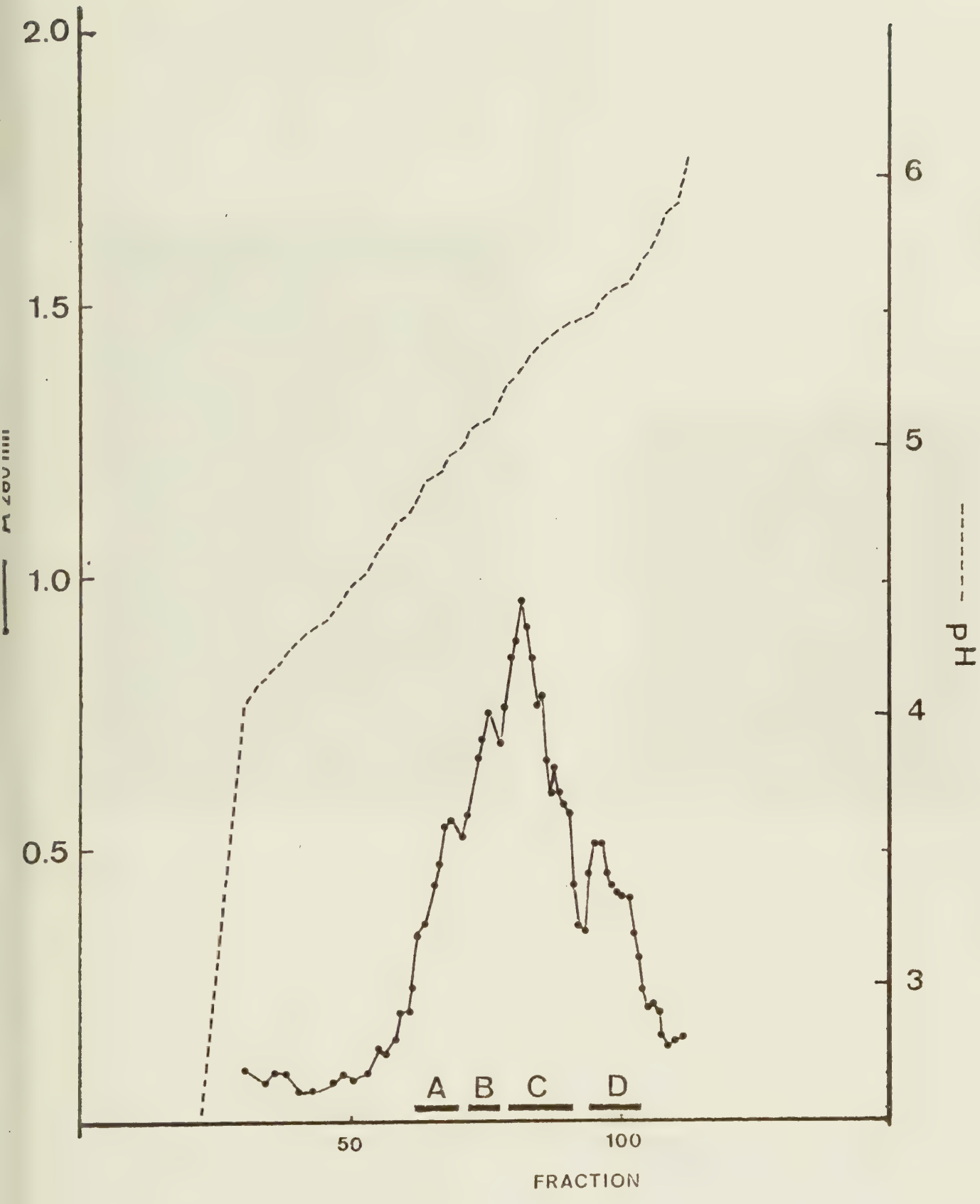
Bien qu'il ne semble pas que l'acide sialique joue un rôle dans la fixation des protéases par l' α_2-MG (**62**), il était nécessaire de vérifier que la microhétérogénéité observée pour la protéine lui était bien due ; aussi la focalisation isoélectrique de la protéine désialisée a été étudiée.

Un premier traitement à la neuraminidase pendant 24 heures laisse environ 25 % de l'acide sialique lié à la protéine (Fig. **8**).

Après une dialyse prolongée et une nouvelle hydrolyse enzymatique de 16 heures, l'α_2-MG ne contient plus d'acide N-acétyl neuraminique (< 0.1 %) comme observé par chromatographie en phase gazeuse des glucides de la protéi

L'électrofocalisation, dans un gradient de pH 4-7, de l'α_2-MG complètement désialisée (Fig. 8) montre un profil d'élution très différent de ceux obtenus avec la protéine native. Le pic protéique majeur est déplacé vers un point isoélectrique de 5.87, supérieur à celui du matériel non traité (5.30). De plus, les pics mineurs ont disparu et un seul pic étroit et symétrique est observé.

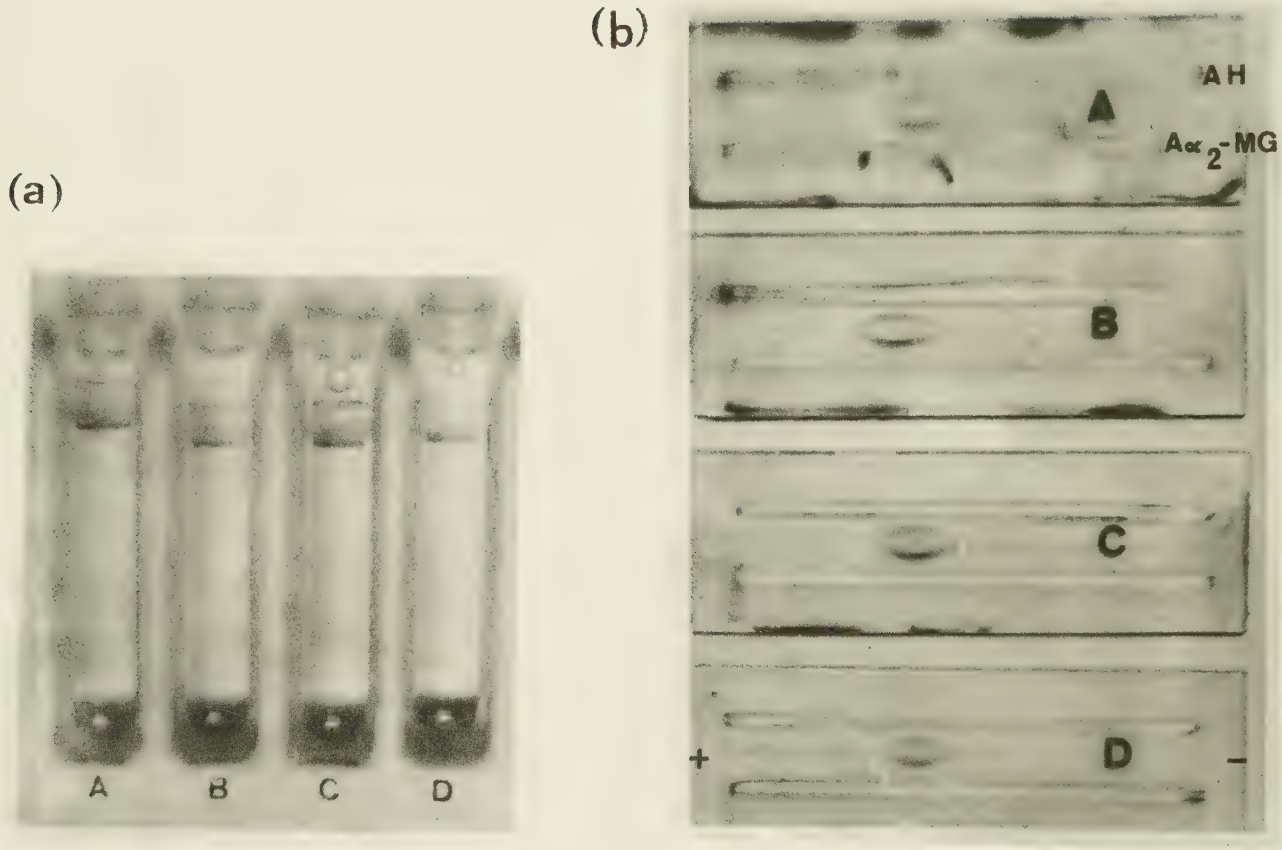
Fig. 5



Electrofocalisation de l'α_2-Macroglobuline humaine dans un gradient de pH 4-6.

α_2-MG : 50 mg, fractions : 3.8 ml.

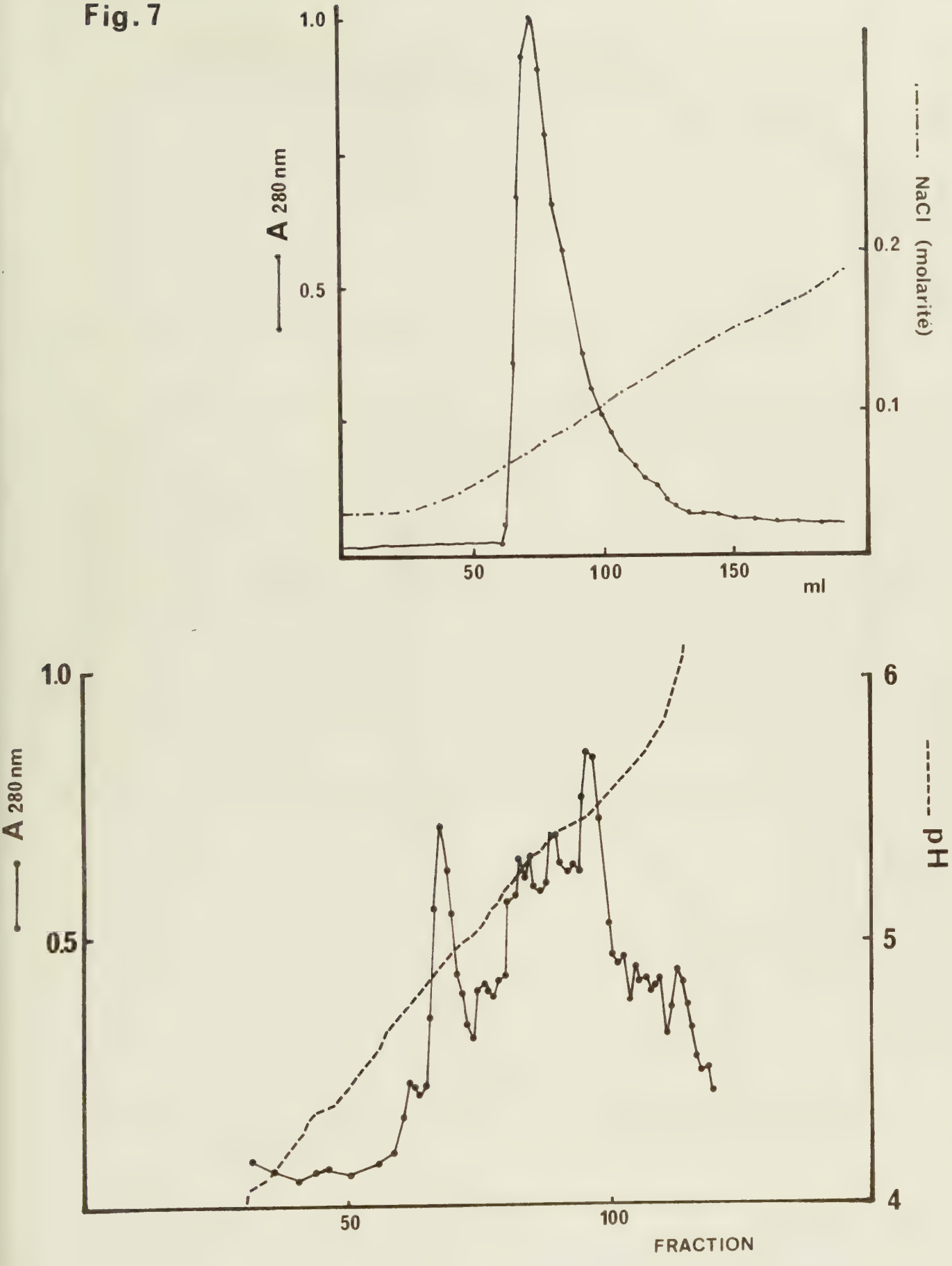
Fig. 6



Homogénéité des quatre fractions isolées par électrofocalisation de l'α_2-Macroglobuline humaine.

(a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 10.2
(b) Immunoélectrophorèse
AH : antisérum humain total
Aα_2-MG : sérum de lapin anti α_2-MG

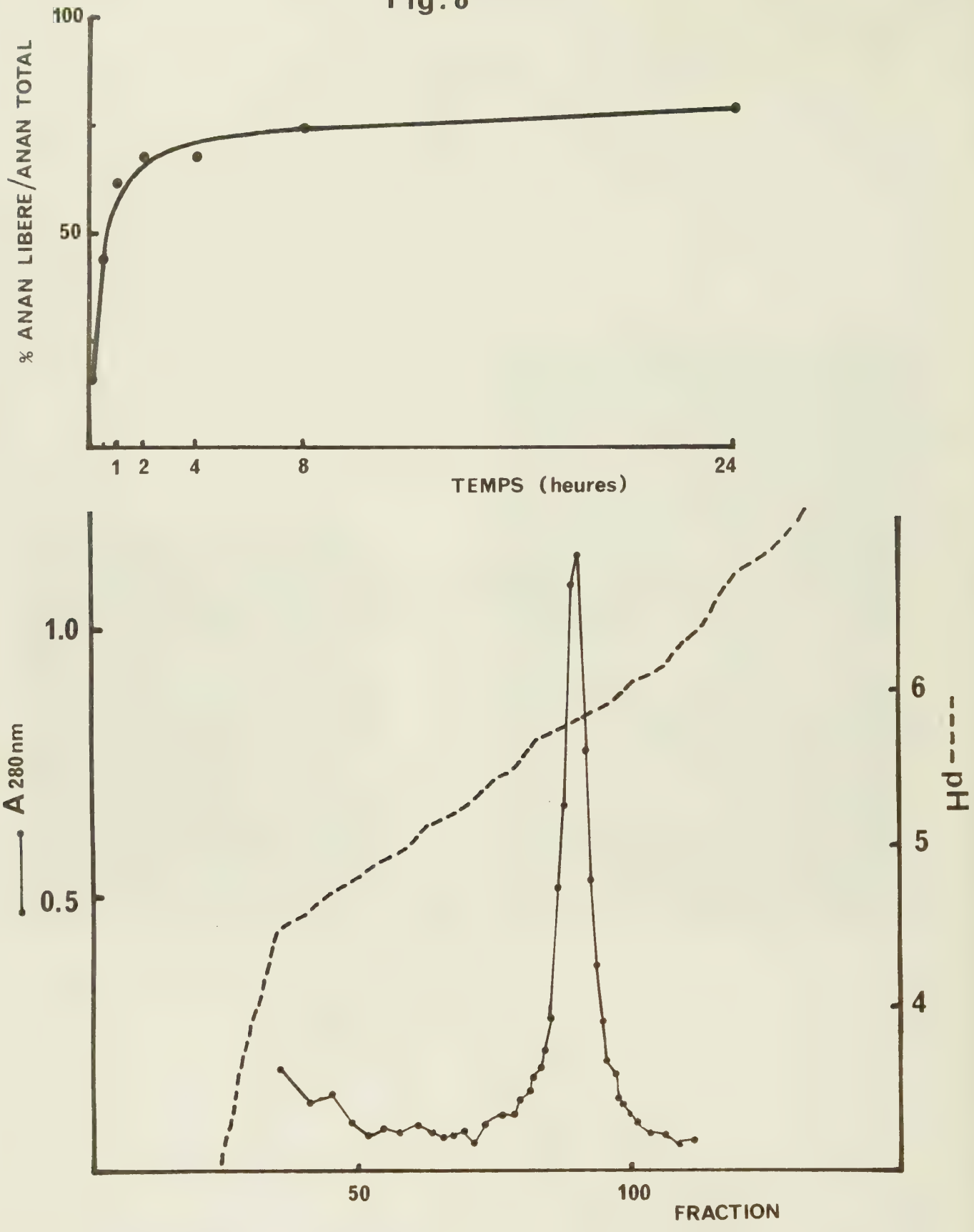
Fig. 7



Chromatographie sur DEAE-cellulose de 60 mg d'α_2-MG humaine dans le tampon phosphate de sodium 0.02M, pH 7.4. La colonne est éluée par un gradient 0-0.2M NaCl (200 ml) dans le tampon. Fractions de 2 ml.

Electrofocalisation de l'α_2-MG humaine après DEAE - cellulose (50 mg), gradient de pH 4-6, fractions de 3.8 ml.

Fig. 8



Traitement à la neuraminidase de l'α_2-MG humaine pendant les premières 24h. d'hydrolyse.
L'acide sialique (ANAN) libéré est dosé sur des aliquotes par la méthode à l'acide thiobarbiturique.

Electrofocalisation de 60 mg d'α_2-MG après traitement à la neuraminidase. Gradient de pH 4-7, fractions de 3.8 ml.

TABLEAU III COMPOSITION GLUCIDIQUE DES QUATRE FRACTIONS OBTENUES PAR ELECTROFOCALISATION DE L'α_2 -MG HUMAINE

	A	B	C	D
Mannose	3.04	3.14	3.01	2.99
Galactose	2.79	1.72	1.45	1.28
N-Acétylglucosamine	3.57	3.20	3.39	3.36
Acide N-Acétylneuraminique	2.74	2.33	2.23	1.62
Mannose/Galactose	1.09	1.83	2.08	2.34

Les valeurs sont exprimées en g par 100 g de protéine.

TABLEAU IV POINTS ISOELECTRIQUES DES α_2-MACROGLOBULINES HUMAINES

α_2-MG (origine)	Points isoélectriques[+]
Native	
. Pool de sérum	4.97, 5.12, <u>5.30</u>, 5.50
. Pool (préparation au rivanol)	4.82, <u>5.26</u>, 5.48
. Individuelle homme	4.96, <u>5.18</u>, 5.32, 5.43
. Individuelle femme	4.87, <u>5.33</u>, 5.59
Modifiée	
. Après chromatographie sur DEAE-cellulose	4.90, <u>5.45</u> (de 5.0 à 5.80)
. Après traitement à la neuraminidase	<u>5.87</u>

+ Les valeurs soulignées correspondent aux points isoélectriques des constituants les plus représentés.

2.2.4 DISCUSSION

Le pHi 5.30 trouvé pour le pic principal de l' α_2 -macroglobuline en isoélectrofocalisation est légèrement inférieur à celui 5.4 qui avait été trouvé par d'autres techniques (**97** ,**156**), et en accord avec le récent résultat d' HAMBERG et al.(**157**). Ces chiffres sont supérieurs à ceux trouvés pour les macroglobulines animales dont certaines, l' α_1 -MG de lapin (**108**) et l' α_2-MG de souris (**24**) ont été déclarées hétérogènes par électrofocalisation.

Les constituants secondaires de l' α_2-MG humaine n'avaient jamais été préparés, quoique JONES et al.(**98**) aient noté l'existence de deux ou trois bandes mineures entre 5.4 et 5.6, à côté du composant majeur 5.4 en focalisation en gel de polyacrylamide.

La microhétérogénéité observée peut être due à différentes origines comme indiqué dans une revue récente par WILLIAMSON et al.(**158**). Il ne semble pas qu'elle puisse être attribuée à une modification chimique survenue au cours de l'isolement de la protéine car celui-ci est effectué rapidement à basse température et l'étape de DEAE-cellulose, pouvant libérer une partie de l'acide sialique, est évitée.

Par électrophorèse croisée antigène-anticorps, GANROT et LAURELL (**90**) avaient mis en évidence deux pics d' α_2-MG dans le sérum humain. Le traitement à la neuraminidase n'entrainant pas de changement, cette hétérogénéité a été attribuée à la formation de complexes entre l' α_2-MG et d'autres composés tels les hormones et les protéases.

Plus récemment SAUNDERS et al.(**91**) ont observé deux bandes d' α_2-MG en électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 8.9 et cinq espèces moléculaires à pH 7.8. Dans les deux cas l'addition de quantités stoechiométriques de trypsine à la protéine entrainaient la disparition des bandes lentes ne laissant qu'une bande protéique, sur le gel de polyacrylamide, constituée du complexe trypsine-α_2-MG. Cependant ces résultats ont été discutés et attribués à une dénaturation partielle de la protéine du fait d'un contact prolongé avec le tampon Tris-HCl (**159**).

Les résultats trouvés dans le présent travail suggèrent que la microhétérogénéité de l' α_2 -macroglobuline humaine est reliée à une glycosylation plus ou moins complète de ses unités glucidiques. L'origine de cette microhétérogénéité démontrée par électrofocalisation de l' α_2-MG désialisée est confirmée par la variation en acide sialique et surtout le contenu en galac-

tose des différentes fractions ; ces variations du pourcentage en galactose excluant l'action possible d'une neuraminidase au cours de la préparation de la protéine.

Ces résultats sont en parfait accord avec l'hétérogénéité des glycopeptides de l' α_2-MG préparés par digestion pronasique et qui á été montrée en chromatographie sur DEAE-cellulose par DUNN et SPIRO (**88**) et en électrophorèse de zone par BOURRILLON et al.(**89**). L'analyse met en évidence une grande variation dans la taille et la composition des unités oligosaccharidiques. Il a été suggéré que la structure des différentes unités glucidiques représente différentes étapes d'achèvement d'un type unique de modèle structural. Chaque glycopeptide contenant une partie interne composée de trois résidus mannose et de deux résidus N-acétyl-glucosamine auxquels les sucres les plus externes sont liés dans des quantités variables (**88**).

Une hétérogénéité plus discrète de la protéine ne peut être exclue, elle pourrait être due à un assemblage au hasard de possibles sous-unités différentes (**109**) ou être d'origine génétique (**95,160**).

3. CARACTERISATION ET PROPRIETES PHYSIQUES DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE

Certaines caractéristiques physiques des α-macroglobulines humaines et animales ont été rapportées (Tableau I), mais peu d'études conformationnelles de ces protéines ont été entreprises (**21,97**). La connaissance des propriétés physicochimiques de l'α_2-MG devrait faciliter la compréhension de ses propriétés biologiques.

3.1. ETUDE DE L'α_2-MG A pH NEUTRE

L'α_2-Macroglobuline humaine a été étudiée par ultracentrifugation, électrophorèse en gel de polyacrylamide et sa structure secondo-tertiaire a été explorée par dichroïsme circulaire, fluorescence et polarisation de fluorescence.

3.1.1. ULTRACENTRIFUGATION - POIDS MOLECULEIRE

Le coefficient de sédimentation à dilution infinie de l'α_2-MG humaine a été déterminée à 20°C :

$$s^0_{20,w} = 19.4 \text{ S}$$

Ce résultat est en accord avec les valeurs précédemment publiées (**97,98**).

Les poids moléculaires trouvés pour les α-Macroglobulines animales (Tableau I) varient de 700 000 à 1 000 000, ces résultats étant fonction de l'espèce, mais aussi et surtout de la technique utilisée.

Un poids moléculaire de 820 000 était généralement accepté pour l'α_2-MG humaine (**97**) ; cette valeur a été remise en question par des études d'équilibre de sédimentation à haute vitesse, des poids moléculaires plus faibles, de 650 000 à 725 000, ont été ainsi obtenus (Tableau V).

Une détermination du poids moléculaire de l'α_2-MG humaine a été effectuée avec l'ultracentrifugeuse préparative du laboratoire équipée d'un banc optique Schlieren, par la technique d'YPHANTIS. Après 24 heures (temps après lequel l'équilibre est généralement considéré comme atteint) de centrifugation à 7010 r.p.m., 20°C, dans le tampon phosphate de sodium mono/disodique 0.05 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M (Fig. **9**).
Le poids moléculaire trouvé est :

$$\text{P.M.} = 736\,000 \quad (\bar{v} = 0.735)$$

Un réexamen de ce résultat a été effectué avec une ultracentrifugeuse analytique équipée d'une optique d'absorption. Les ultracentrifugations

sont réalisées dans le tampon Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 8.5, (densité 1.008) à 60 00 r.p.m. avec des solutions protéiques de densité optique 0.20 et 0.25 à 280 nm. Des enregistrements à différents temps montren que l'équilibre n'est, en fait, pas atteint à la 24ème heure, mais au minimum après 48 heures de centrifugation ; les calculs sont effectués sur des enregistrements à 60 heures. Dans ces conditions, la courbe du logarithme de la concentration en fonction de r^2 (carré du rayon par rapport à l'axe du rotor) est linéaire du ménisque au fond de la cellule (Fig.**10**).

Avec un $\bar{v}$ déterminé à partir de la composition en aminoacides et en glucides de l' α_2-MG, et égal à 0.720, le poids moléculaire calculé est :

P.M. = 780 000 (moyenne de 4 déterminations)

Ce résultat est sensiblement différent de ceux publiés récemment pour l' α_2-MG (**98,99**) alors qu'une technique semblable est employée. De plus, un volume partiel spécifique, $\bar{v}$, égal à 0.720 est utilisé pour le calcul et devrait, toutes conditions identiques par ailleurs, entrainer un abaissement du poids moléculaire par rapport aux poids moléculaires calculés avec $\bar{v}$ = 0.735 ou 0.733 (si $\bar{v}$ = 0.735, le P.M. 780 000 devient 825 000).

Deux explications à cette divergence :

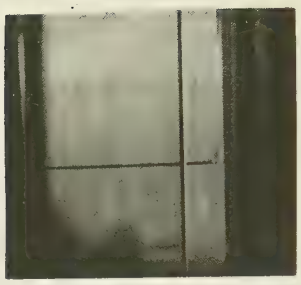
- la préparation d' α_2-MG contient des protéases liées à la protéine, "gonflant" le poids moléculaire. Outre que cette explication ne peut suffire à expliquer à elle seule les différences dans les résultats, il faudrait admettre, en raison des poids moléculaires relativement faibles de ces enzymes, qu'au moins 2 molécules de protéases soient liées par molécule d' α_2-MG (hypothèse discutée) et que toutes les molécules d' α_2-MG sont ainsi complexées, hypothèse peu probable étant données les précautions prises au cours de la préparation de la protéine (cf § 5.5).

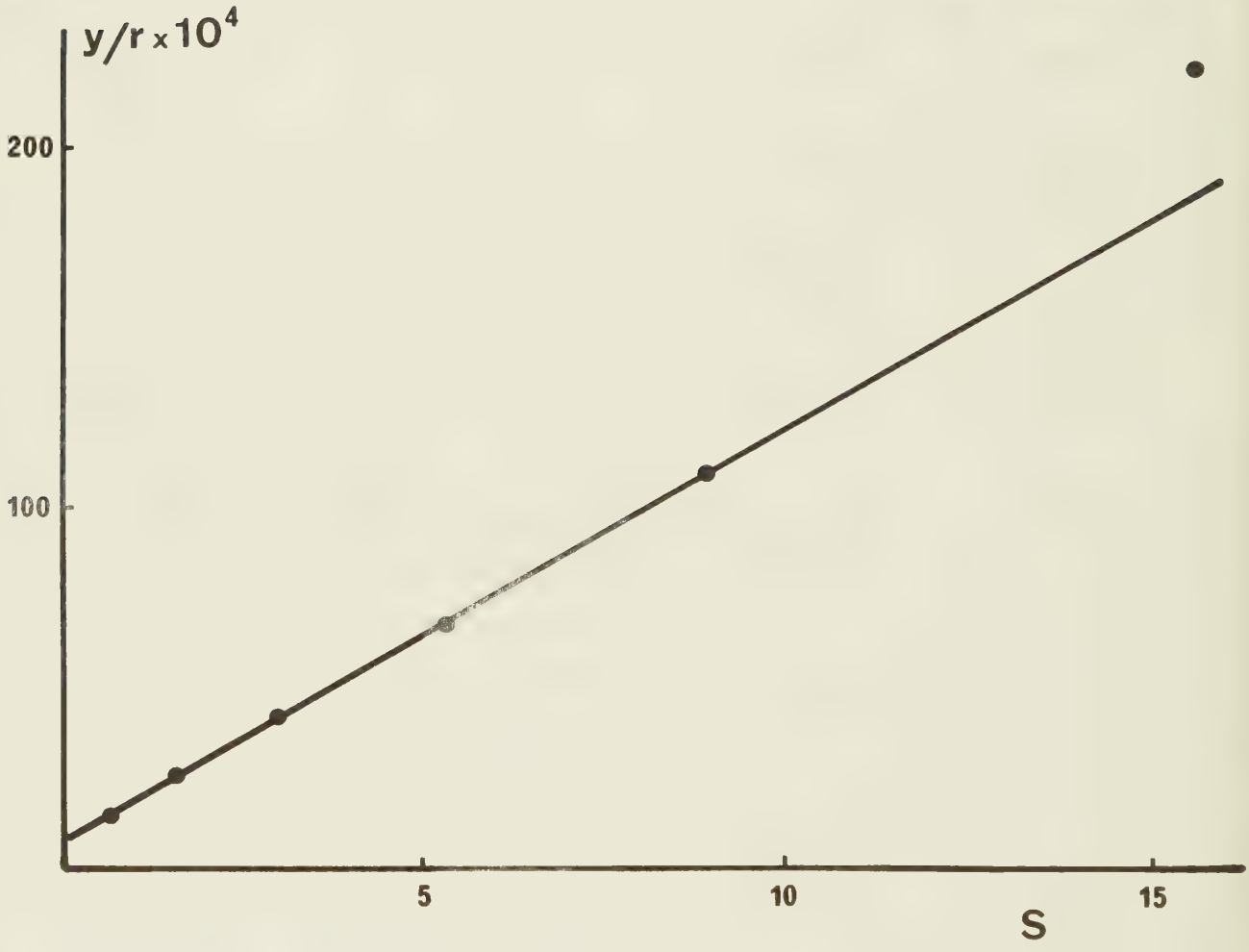
- la divergence provient du temps considéré comme nécessaire pour l'atteinte de l'équilibre de sédimentation. Les poids moléculaires 650 000 et 725 000 étaient probablement déterminés, comme lors de notre première expérimentation P.M. = 736.000, après 24 heures de centrifugation. Cette précision n'est généralement pas fournie dans les publications et il est clair que l'équilibre de sédimentation n'est pas, pour l' α_2-MG, atteint avant, au moins, 48 heures de centrifugation.

TABLEAU V POIDS MOLECULAIRE DE L' α_2-MG HUMAINE

Poids moléculaire	Technique	$\bar{v}$	Auteurs
820.000	Sédimentation-Diffusion	0.735	SCHÖNENBERGER et al. (97)
920.000	Diffusion de la lumière		" "
650.000	Equilibre de sédimentation équilibre 24 h	0.733	SAUNDERS et al.(91)
725.000	Equilibre de sédimentation	0.735	JONES et al.(98)
725.000	Equilibre de sédimentation	0.735	ROBERTS et al.(99)
780.000	Equilibre de sédimentation équilibre 60 h	0.720	Ce travail

Fig. 9

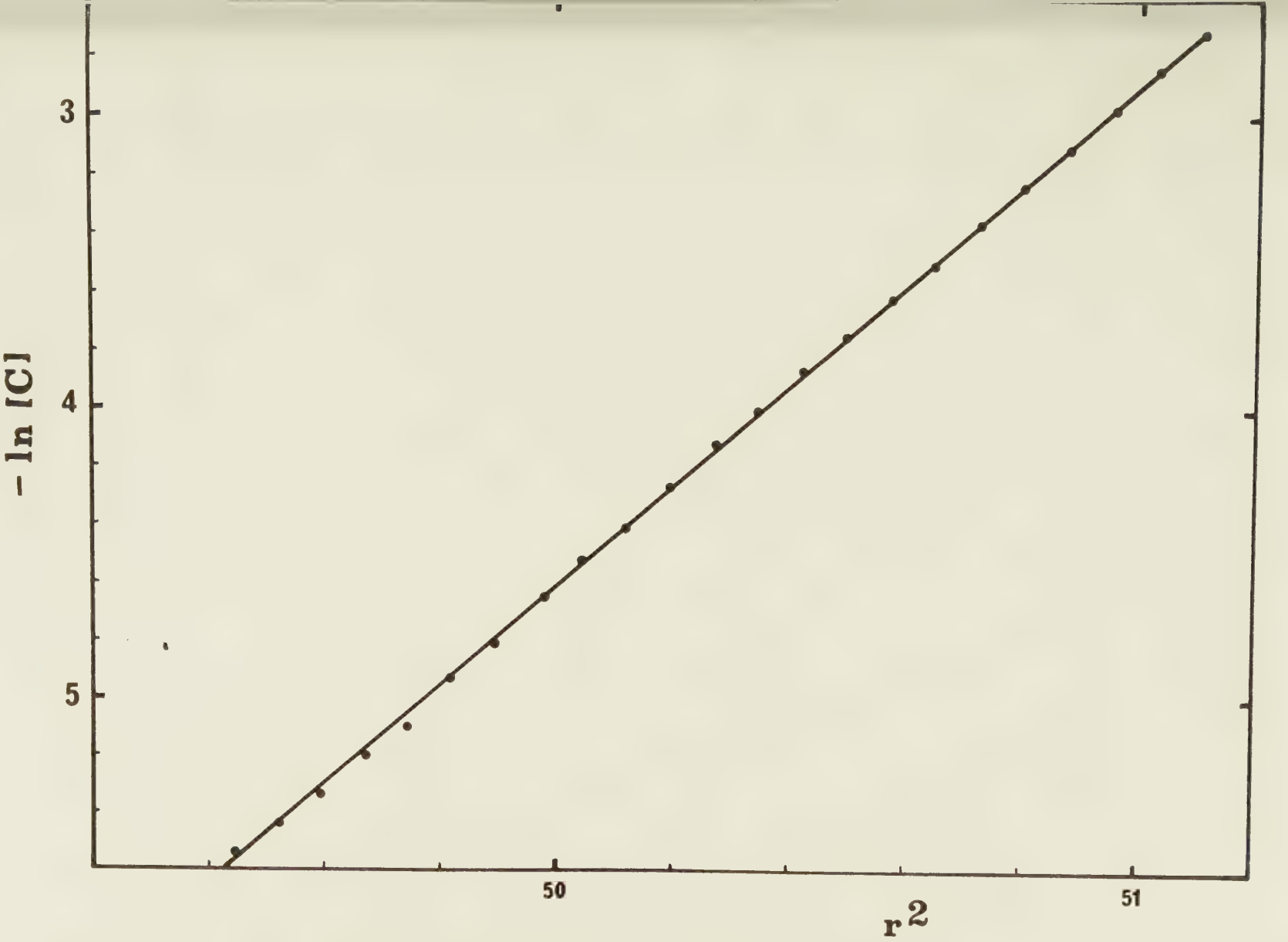




Equilibre de sédimentation de l'α_2-Macroglobuline humaine.

Tampon phosphate de sodium 0.05M, NaCl 0.15M, pH. 7.4, 7010 rpm.
Ultracentrifugeuse L2 65B, optique Schlieren.
Pour le calcul du poids moléculaire (cf. matériel et méthodes), la pente de la droite y/r = f(S) est corrigée par G^2 (G, facteur de grandissement de l'optique = 60.9).

Fig. 10



Equilibre de sédimentation de l'α_2-Macroglobuline humaine.

Tampon Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.15M, pH 8.5, 6000 rpm. Ultracentrifugeuse modèle E, optique d'absorption. Le logarithme négatif de la concentration protéique (-lnC) en g/100 ml est porté en fonction du carré du rayon par rapport à l'axe de rotation (r^2) en cm.

3.1.2 - CARACTERISATION DE L'α_2-MG PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

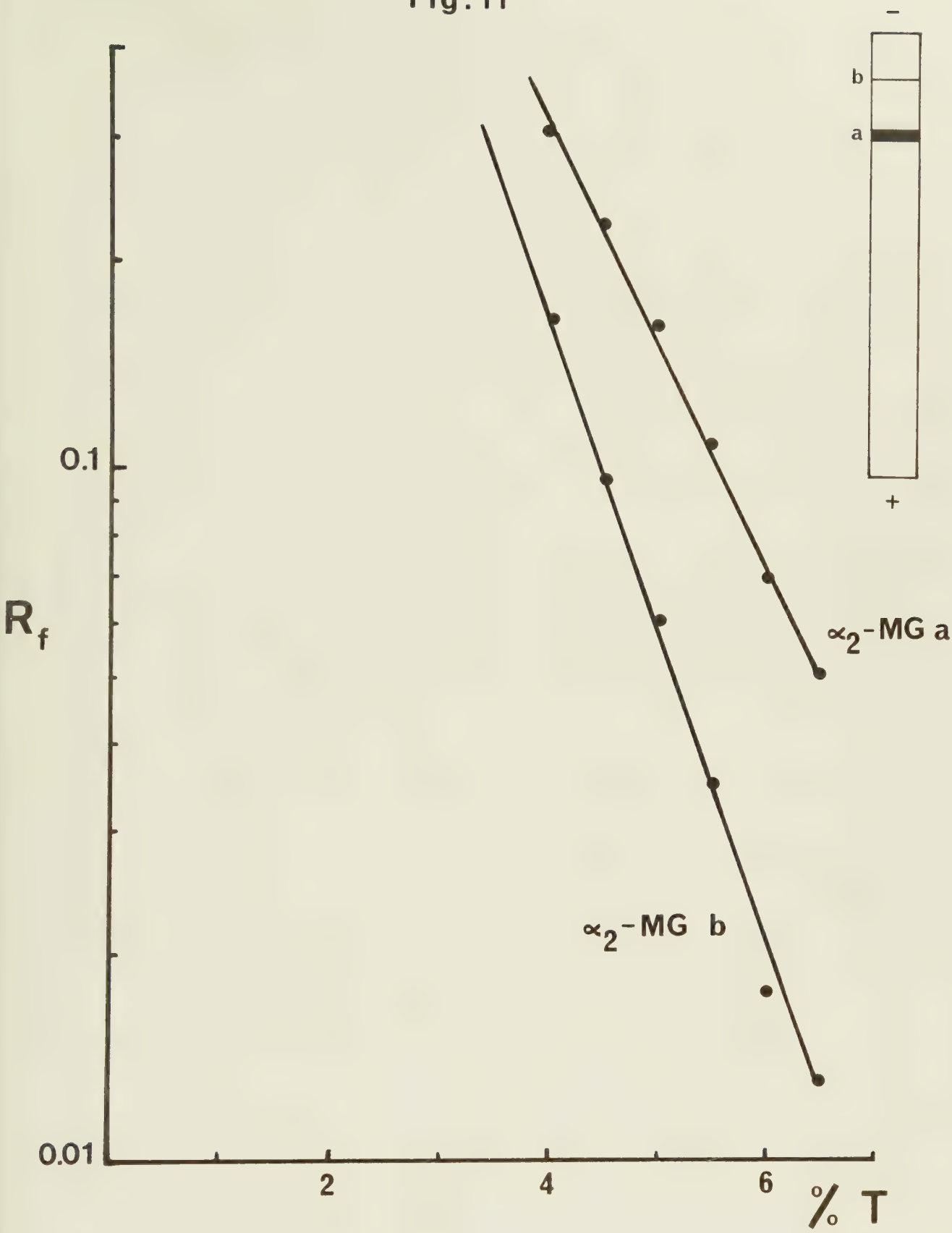
Etudiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide ou en gel d'amidon, les préparations d'α_2-MG humaine présentent fréquemment à côté de la bande principale, une seconde bande, mineure retardée (**80 , 97**).

Les systèmes d'électrophorèse décrits par RODBARD et CHRAMBACH (**115**) permettent, en se rapportant à des courbes standard établies à l'aide de protéines connues, le calcul de certaines caractéristiques physiques des protéines étudiées : le rayon moléculaire, la mobilité, la charge nette (valence) et le poids moléculaire. Ces systèmes doivent donc permettre la mise en évidence d'une relation entre les deux constituants observés en gel dans les préparations d'α_2-MG.

Une préparation d'α_2-MG native et une préparation désialisée ont été testées dans les systèmes B, pH 10.2 (Fig. **11**) et D, pH 7.5. Les constantes physico-chimiques de la bande principale et de la bande mineure de ces deux préparations sont rapportées dans le tableau **VI**.

En raison du grand nombre d'approximations utilisées dans ce système de calcul qui suppose que toutes les molécules sont sphériques, non hydratées avec un volume partiel spécifique molaire $\bar{v} = 0.74$, les résultats doivent être considérés avec prudence, le poids moléculaire n'étant qu'une approximation. Il est toutefois possible d'affirmer que la deuxième bande mineure observée en gel est le dimère de la protéine et non pas la sous unité 11-12 S, comme cela avait été envisagé (**80**). Ce résultat a d'ailleurs été confirmé, par une méthode différente, gel-filtration sur Indubiose Ac/A2-2, pour l'α_1-macroglobuline de lapin (**161**).

Fig.11



"Ferguson plots" de l'α_2-Macroglobuline humaine.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide dans le système B, pH 10.2.
La courbe représente le logarithme du R_F des protéines en fonction de la concentration d'acrylamide (% T).

TABLEAU VI PROPRIETES PHYSIQUES DES α_2-MACROGLOBULINES HUMAINES DETERMINEES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Système D pH 7.5	K_R [a]	Yo [b]	R mμ [c]	Poids moléculaire	Mobilité [d]	Charge Nette [e]
α_2-MG	0.2854 ± 0.0175	6.359 ± 0.848	7.733	1 578 000	- 25.71	- 129.30
bande mineure	0.3647 ± 0.0224	7.160 ± 1.895	8.971	2 463 000	- 28.94	- 185.60
α_2-MG désialisée	0.2789 ± 0.0110	4.724 ± 0.585	7.624	1 512 000	- 19.10	- 93.85
bande mineure	0.3693 ± 0.0187	6.180 ± 1.315	9.038	2 519 000	- 24.98	- 162.10
Système B pH 10.2						
α_2-MG	0.3048 ± 0.0079	5.246 ± 0.454	7.055	1 198 000	- 31.74	- 159.50
bande mineure	0.4524 ± 0.0112	10.780 ± 1.260	8.794	2 321 000	- 65.23	- 472.30
α_2-MG désialisée	0.2493 ± 0.0043	3.176 ± 0.156	6.293	850 300	- 19.22	- 80.07
bande mineure	0.3829 ± 0.0140	6.547 ± 1.012	8.017	1 758 000	- 39.61	- 245.80

a "Coefficient de retardement" : pente de la droite de régression $\log R_F = f(\%T)$

b Intersection de la courbe de Ferguson avec l'axe des ordonnées

c Rayon moléculaire = $\sqrt[3]{\frac{3\ PM\ \bar{v}}{4\ \pi\ N}}$, en supposant molécule sphérique, non hydratée, $\bar{v} = 0.74$.

d (cm/sec) / (volts/cm) x 10^5

e net protons/molécules

3.1.3 - STRUCTURE SECONDAIRE - DICHROISME CIRCULAIRE

Le spectre de dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain de l'α_2-MG à 25°C et pH 7.0, dans le tampon phosphate de sodium 0.01 M est montré dans la Fig. **12** . Il contient un seul extremum négatif vers 217 nm. Une telle transition négative voisine de 217 nm est attribuée à la présence dans les protéines d'une structure en feuillet plissé antiparallèle (structure β). Un spectre assez semblable a d'ailleurs été rapporté pour les immunoglobulines (**162-163**), de nombreuses lectines (**164-166**), la β-lactoglobuline (**167**), la ribonucléase (**168**) et l'élastase (**169**) ; toutes ces protéines contiennent un fort pourcentage de structure β, dont l'existence a été confirmée par d'autres techniques physiques comme la spectroscopie infrarouge ou la diffraction des rayons X.

Les analyses de ce spectre de dichroïsme circulaire de l'α_2-MG entre 208 et 228 nm (moyenne de 4 enregistrements), ont été effectuées à l'ordinateur en se référant aux paramètres fournis par l'étude des différentes configurations de polypeptides synthétiques tels la poly-L-lysine par GREENFIELD et FASMAN (**168**)et de protéines connues par SAXENA et WETLAUFER (**170**).

Réf. Analyse	α-hélice	feuillet β-plissé	pelote statistique (structure non ordonnée)
GREENFIELD et FASMAN (**168**)	0-1 %	36 %	64 %
SAXENA et WETLAUFER (**170**)	0	43 %	57 %
CHEN et al. (**171**)	< 2 %	n.d.	n.d.

En se référant à l'analyse de protéines de structure connue, CHEN et al. (**171**) ont établi une équation permettant d'obtenir une valeur approximative du % d'α-hélice, f_H, d'une protéine à partir de la valeur de l'ellipticité $[\theta]$ à 222 nm.

$$[\theta]_{222} = -30300 \cdot f_H - 2340$$

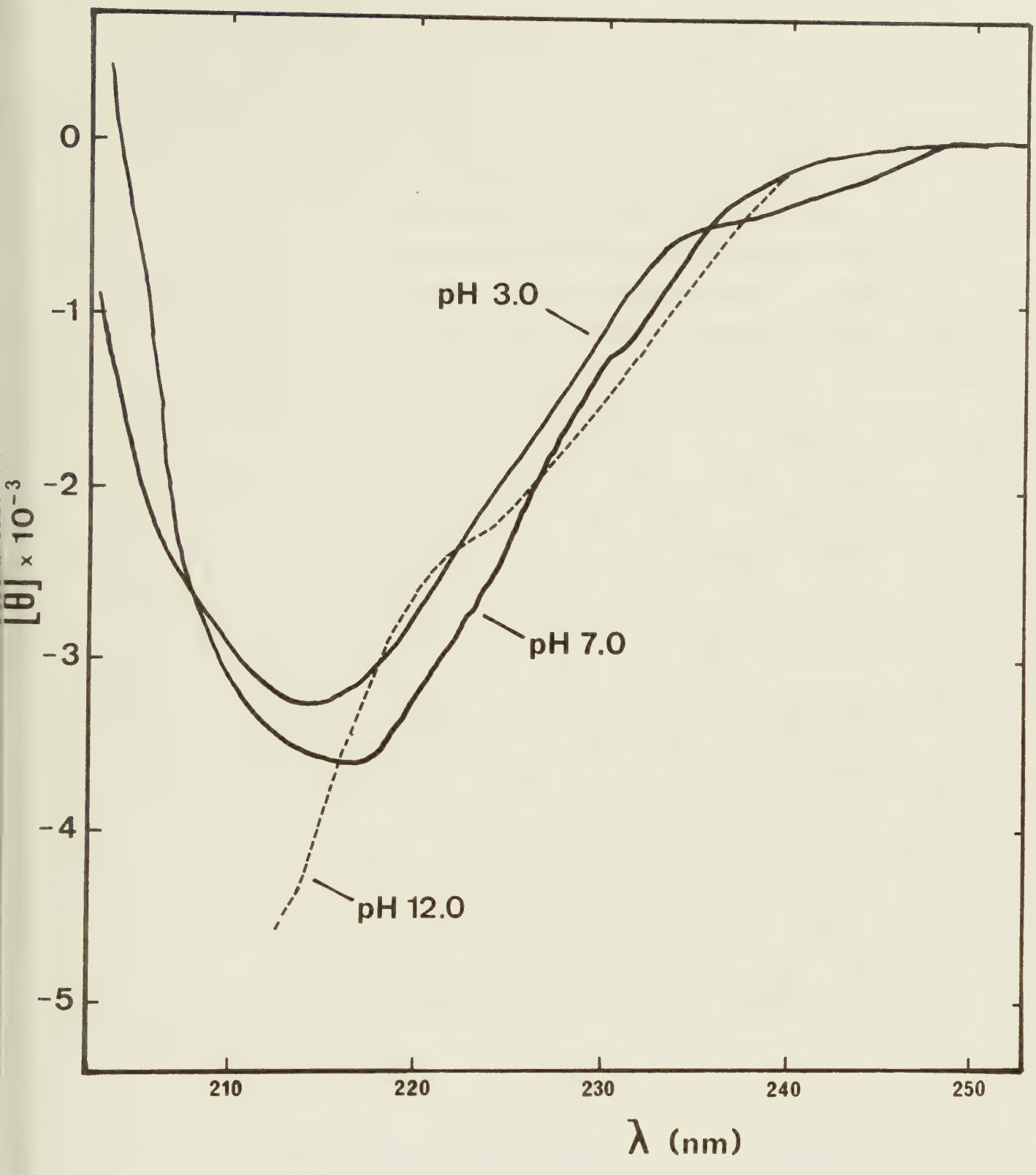
Pour l'α_2-MG à 25°C, $[\theta]_{222} \neq -2900$ deg. cm^2 . dmole^{-1}, soit un

pourcentage d'α-hélice, f_H, inférieur à 2 %, en parfaite concordance avec les résultats de la comparaison avec les polypeptides synthétiques.

Les chiffres révèlent la présence d'environ 40 % de structure β et surtout l'absence quasi-totale d'α-hélice dans la molécule d'α_2-macroglobuline humaine. Ils sont comparables aux 6 % d'α-hélice et 40 % de structure β rapportés pour l'α_2-MG de porc étudiée en dispersion optique rotatoire par JACQUOT-ARMAND et GUINAND (**21**), et aux 4 % d'α-hélice qu'il est possible de calculer pour l'α_2-MG humaine d'après la constante de MOFFIT, b_o, déterminée par dispersion optique rotatoire par JONES et al. (**98**).

L'α_2-MG étant une glycoprotéine, la question se pose de savoir si les constituants glucidiques ne pourraient pas modifier les spectres de dichroïsme circulaire et fausser le pourcentage calculé de structure β, structure attribuée à la chaîne polypeptidique et plus particulièrement aux aminoacides, méthionine, valine, isoleucine et cystéine (**172**). Il semble qu'il n'en soit rien, les glucides n'interfèrent apparemment pas avec les spectres de dichroïsme circulaire dans la zone de transition des 217 nm (**173**).

Fig. 12



Spectres de dichroïsme circulaire de l'α_2-MG humaine.

Phosphate de sodium 0.01M, 25°C.

3.1.4 STRUCTURE TERTIAIRE - FLUORESCENCE - POLARISATION DE FLUORESCENCE

Le pic d'émission de fluorescence de l' α_2-MG humaine (Fig13) a son maximum à 323-325 nm lorsque la molécule est excitée à 280 nm (excitati des résidus tyrosine et tryptophane). Ce maximum correspond à une fluorescence prédominante des résidus tryptophane de la protéine par rapport aux résidus tyrosine; leur environnement est très hydrophobe, le pic étant considérablement déplacé vers les faibles longueurs d'onde ("blue shifted") par rapport aux spectres des peptides à tryptophane en solution aqueuse.
Ce déplacement est également très marqué par rapport au spectre d'émission de l' α_2-MG en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M, λ max = 343 nm, dans ce dernier cas un épaulement à 305 nm est attribuable aux tyrosines.

Lorsque l' α_2-MG est soumise à une longueur d'onde excitatrice 295 nm, n'excitant que les résidus tryptophane, le maximum d'émission est déplacé vers 329-330 nm concordant avec le maximum d'émission observé pour l' α_2-MG de porc (**174**), λ_{max} = 330 nm, lorsque la molécule est excitée à 290 nm.

La polarisation du complexe α_2-MG-DNS est relativement forte, et à 25°C, égale à 0.20.

Si la taille et la forme d'une protéine restent fixes, la dépendance de la polarisation en fonction de la température et de la viscosité obéit à l'équation de Perrin. C'est ce qui se passe pour la molécule d' α_2-MG la courbe $(\frac{1}{P} + \frac{1}{3}) = f(\frac{T\tau}{\eta})$ est linéaire de 5 à 55°C (Fig. **14**).
Il est possible d'en déduire le temps de relaxation, ρ_h, de la protéine qui est :

$$\rho_h = 60.4 \text{ ns}$$

Cette valeur est corrigée pour les variations de fluorescence en fonction de la température.

Le temps de relaxation d'une sphère rigide, non hydratée, de poids moléculaire 780 000 et de volume partiel spécifique $\bar{v} = 0.720$ est

$$\rho_o = 612 \text{ ns}$$

Le rapport de relaxation ρ_h/ρ_o est donc :

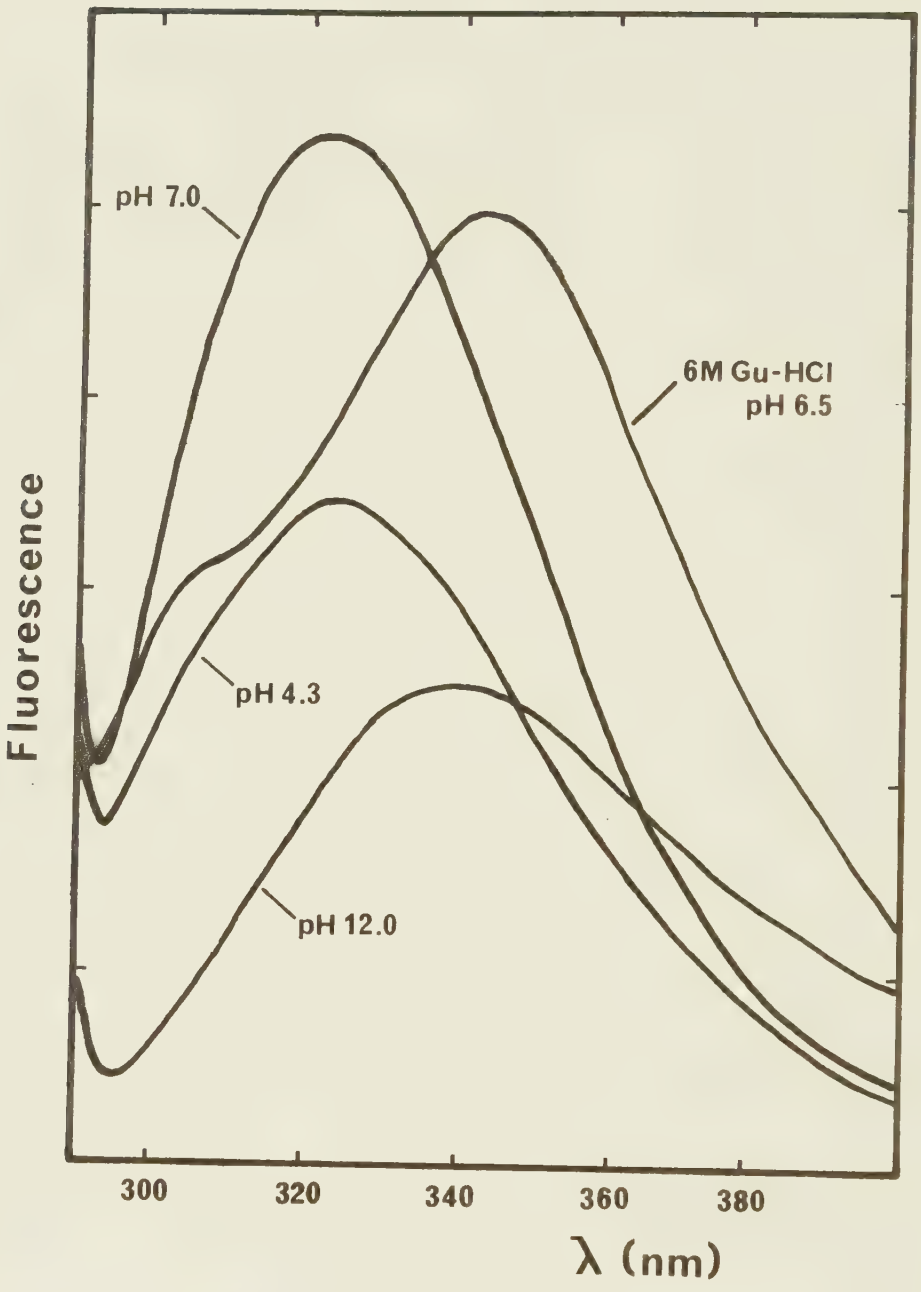
$$\rho_h/\rho_o = 0.1$$

Ce rapport est le paramètre moléculaire enregistrant le plus fidèlement les degrés de liberté de rotation interne d'une protéine (**175**) ; pour les protéines, il est généralement compris entre 1 et 2, avec quelques

exceptions comme les γ globulines et la thyroglobuline.

Aussi pour l'α_2-MG ce rapport très faible comme pour la thyroglobuline, protéine présentant beaucoup d'analogies avec l'α_2-MG (**109**) et un ρ_h/ρ_o égal à 0.27 (**127**), indique que la molécule est peu rigide et possède de nombreux degrés de liberté de rotation interne. En effet, un rapport de relaxation ρ_h/ρ_o 0.10 indique que les "domaines" structurés de la molécule n'occupent qu'environ 10% du volume de la molécule, le reste étant relié par des parties polypeptidiques "random". Une liberté de rotation entre les deux sous-unités 11-12S pourrait expliquer un rapport ρ_h/ρ_o voisin de 0.5,aussi il est nécessaire de supposer une rotation interne de certains résidus de la même chaîne.

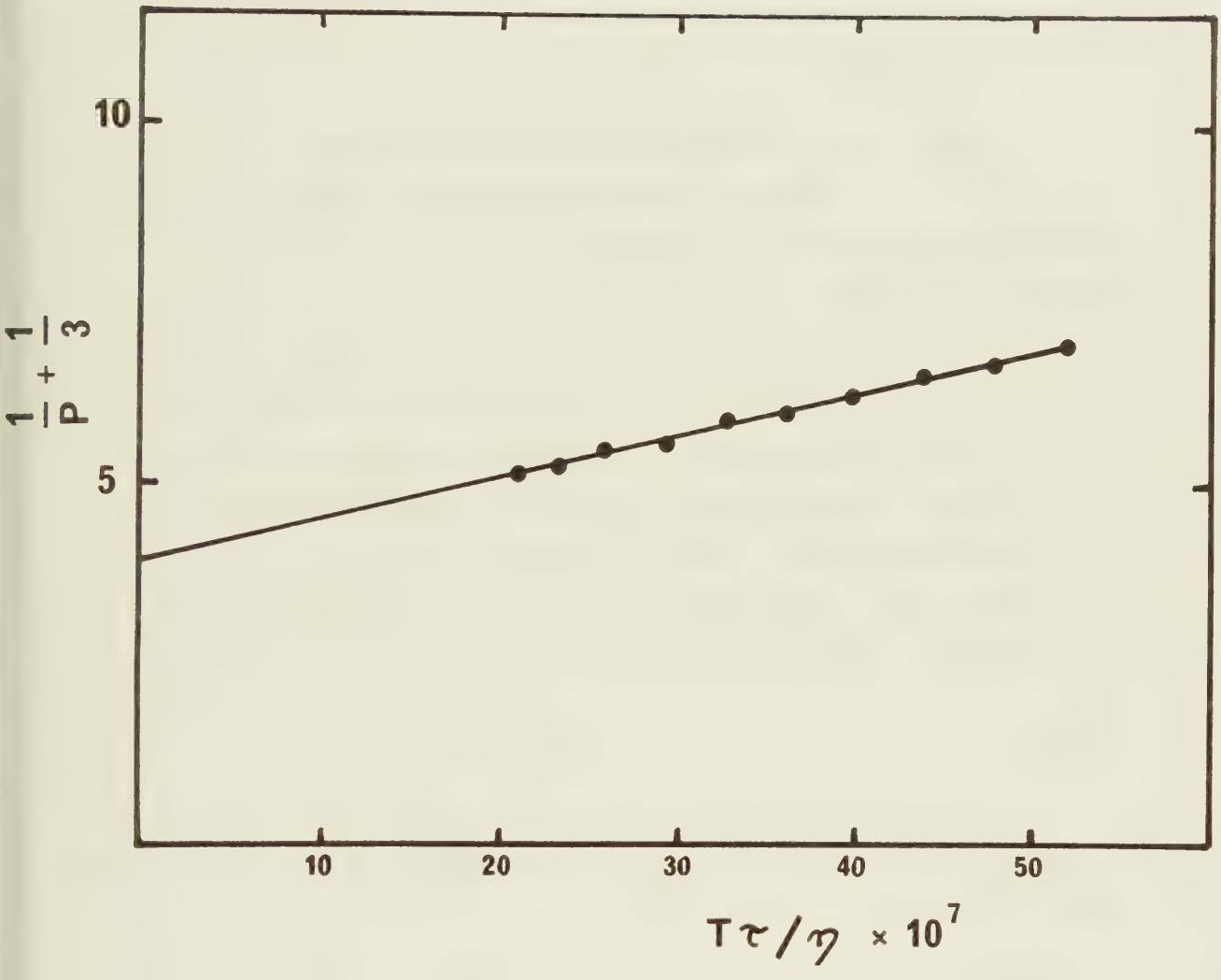
Fig. 13



Spectres d'émission de fluorescence de l'α_2-MG humaine.

Phosphate de sodium 0.01M, 25°C
Excitation à 280 nm.
Concentration protéique 0.14 mg/ml.

Fig. 14



Effet de la température sur la polarisation du complexe α_2-MG-DNS.

Tampon phosphate de sodium 0.02M, NaCl 0.15M, pH 7.0.
Excitation polarisée à 340 nm, émission à 500 nm.

3.2. - ETUDE DE LA STABILITE DE LA STRUCTURE DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - EFFETS DU pH ET DE LA TEMPERATURE

Les effets du pH et de la température ont été étudiés sur l'α_2-MG par ultracentrifugation, dichroïsme circulaire, fluorescence et polarisation de fluorescence.

3.2.1 - ULTRACENTRIFUGATION

La dissociation de la protéine en fonction du pH n'a pu être mise en évidence par étude de la sédimentation de pH 6 à pH 11 à 5°C et 20°C dans des tampons phosphate de sodium 0.01 M, NaCl 0.15 M. Dans tous les cas, un seul constituant 18-19S est observé.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par PICARD et HEREMANS (**176**) en ultracentrifugation, mais infirment les expériences qu'avait effectuées GENTOU (**100**) dans d'autres conditions, en particulier ultracentrifugations en milieu non tamponné et de force ionique nulle ; ces résultats avaient d'ailleurs été discutés pour ce motif par JONES et al. (**98**).

Cette non-dissociation de la protéine par l'élévation du pH, observée en ultracentrifugation, est confirmée par la détermination des poids moléculaires des α_2-MG, par électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 10.2 (§ 3.1.2) ; ils correspondent à celui de la molécule entière et non à la demi-molécule 11-12S.

Il est à remarquer que la dissociation de l'α_2-MG en fonction du pH est, étudiée en ultracentrifugation, semblable à celle de la thyroglobuline pauvre en iode (**177**).

3.2.2 - STRUCTURE SECONDAIRE - DICHROISME CIRCULAIRE

La structure secondaire de l'α_2-macroglobuline est relativement stable puisque le spectre de dichroïsme circulaire de la protéine n'est pas modifié entre pH 2 et pH 10 ; des modifications dans le sens de la dénaturation sont observées seulement au delà de pH 11 (Fig. **12**). L'extremum négatif est, à pH 12, à 202-203 nm, ce qui correspond à une forme dénaturée de la protéine ; en effet, la lactoglobuline présente

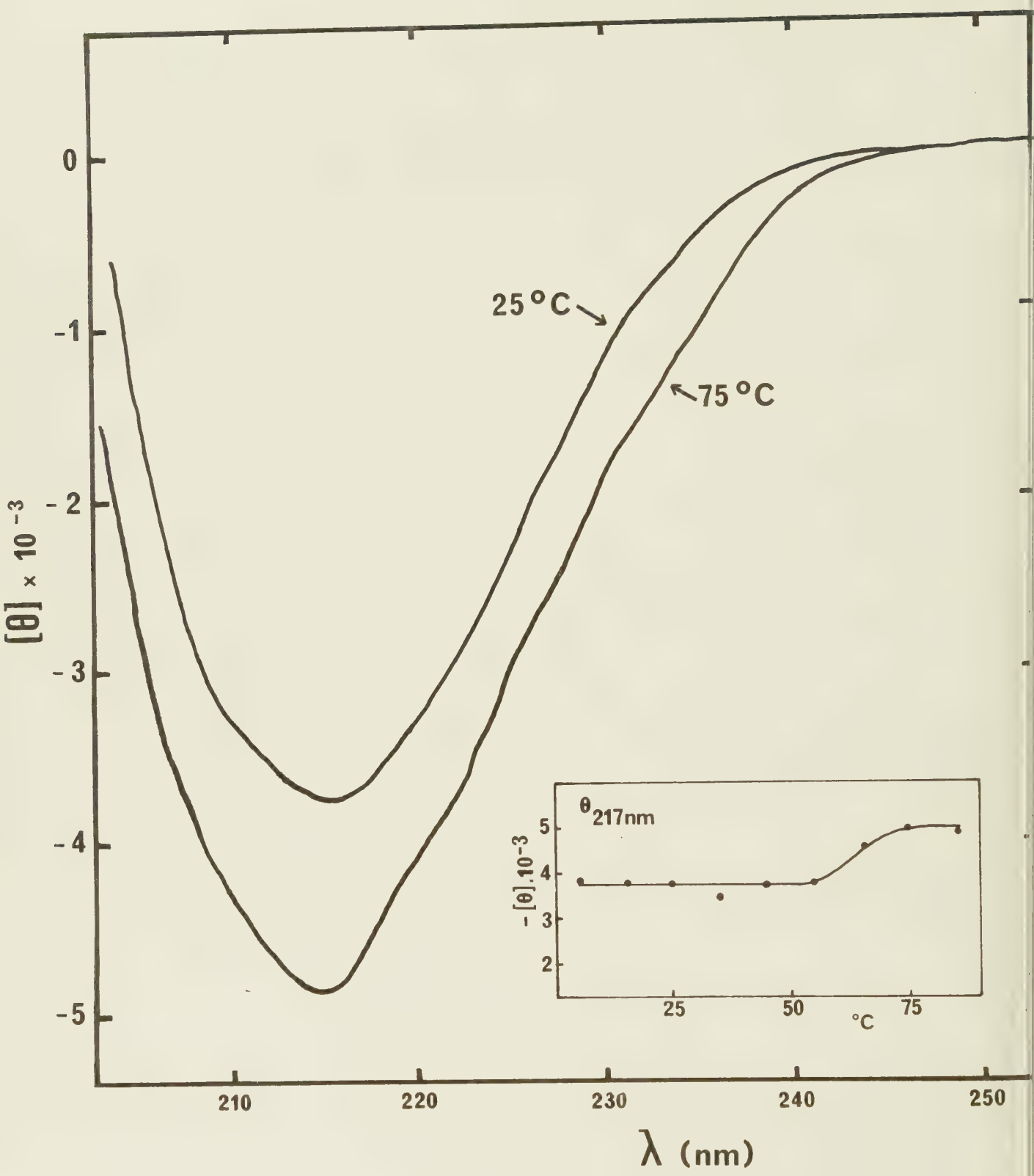
un extremum négatif à 204 nm (167) lorsque sa structure est désordonnée (random chain).

Le spectre de dichroïsme circulaire de l'α_2-MG n'est pas modifié de 5 à 55°C, pH 7.0, alors qu'une augmentation de l'ellipticité à 217 nm, d'environ 30 % est observée à partir de 65°C (Fig. 5).

Ce résultat, qui suggère une augmentation de la structure ordonnée avec l'élévation de la température, est confirmé par l'analyse de la configuration de la protéine à 25°C et 75°C rapportée dans le tableau VII. Par les deux méthodes de calcul, le passage de l'α_2-MG de 25 à 75°C se traduit par une augmentation du pourcentage de feuillet β-plissé d'environ 10 % au dépens de la structure non ordonnée.

Les protéines pour lesquelles la structure $^{\beta}$est prédominante sont généralement très résistantes à la dénaturation par le chlorhydrate de guanidine ou les agents physiques; c'est le cas des γ-globulines (178), de l'orosomucoïde (179), de l'inhibiteur basique de la trypsine isolé du pancréas (180) ; cependant très peu d'études du dichroïsme circulaire en fonction de la température ont été effectuées. Le seul travail réalisé sur des protéines de Bence-Jones de type κ montre comme pour l'α_2-MG, mais en plus marqué, une augmentation du pourcentage de feuillet β-plissé entre 20 et 70°C (181). Aussi, la question se pose de savoir si ce phénomène est spécifique des protéines de structure secondaire riche en feuillet β-plissé.

Fig. 15



Spectre de dichroïsme circulaire de l'α_2-MG humaine à 25 et 75°C.

Tampon phosphate de sodium 0.01M, pH 7.0.

TABLEAU VII CONFIGURATION DE L' α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE A 25°C ET 75°C

Température	Ref. Analyse	α -hélice	feuillet β plissé	pelote statistique
25°C	GREENFIELD et FASMAN (**168**)	0-1 %	36 %	64 %
75°C	"		41 %	59 %
25°C	SAXENA et WETLAUFER (**170**)	0	43 %	57 %
75°C	"		47 %	53 %

3.2.3 - STRUCTURE TERTIAIRE - FLUORESCENCE - POLARISATION DE FLUORESCENCE

La stabilité observée de la structure tertiaire de l'α_2-MG est assez proche de celle de la structure secondaire.

La longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence de l'α_2-MG excitée à 280 nm, est déplacée de 323-325 nm jusqu'approximativement 330 nm, en dessous de pH 4 (Fig. **13**, **16**). A pH supérieur à 11, ce maximum devient 342 nm, correspondant à la longueur d'onde du maximum d'émission en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M, indiquant un déplissement complet de la molécule (ponts disulfures non réduits).

Lorsque l'intensité de la fluorescence est suivie à 340 nm, un déclin ("quenching") normal est observé avec l'augmentation du pH à partir de la neutralité ; il est généralement attribué à un transfert d'énergie aux résidus tyrosine ionisées et a été observé pour de nombreuses protéines (**182**).

Un abaissement du pH est généralement accompagné d'un "quenching" de la fluorescence par les groupements carboxylés protonés comme montré par l'étude en fonction du pH de l'intensité de la fluorescence du dipeptide tryptophanyl-tyrosine (**175**) ; en ce qui concerne l'α_2-MG, une transition discrète est notée, avec l'abaissement du pH, en suivant la fluorescence à 340 nm (Fig. **16**). Cette transition n'est pas dépendante de la concentration et pourrait correspondre au pK de dissociation apparent, 3.4, déterminé par GENTOU (**100**) ; aussi la conformation de la protéine ne semble pas dépendante de la concentration.

En raison de la sensibilité élevée de la fluorimétrie, de très faibles concentrations protéiques peuvent être utilisées (0.0015 %) et la précipitation normalement rencontrée au voisinage du point isoélectrique (5.30) ainsi évitée (**183**).

Entre 5 et 45°C, le déclin de fluorescence à 340 nm de l'α_2-MG est linéaire et superposable à celui de la N-acétyl-tryptophanamide (A.T.A.) utilisée comme référence (Fig. **17**) ; une transition est observée autour de 55°C, parallèle à un déplacement du maximum d'émission de 323 à 332 nm ("red-shift"), ce déplacement du maximum indique un réarrangement moléculaire probablement une perte de structure tertiaire, mais non une dénaturation complète de la protéine. La fluorescence à 500 nm du complexe α_2-MG-DNS présente la même transition en fonction de la température que celle de l'α_2-MG native (Fig. **17**).

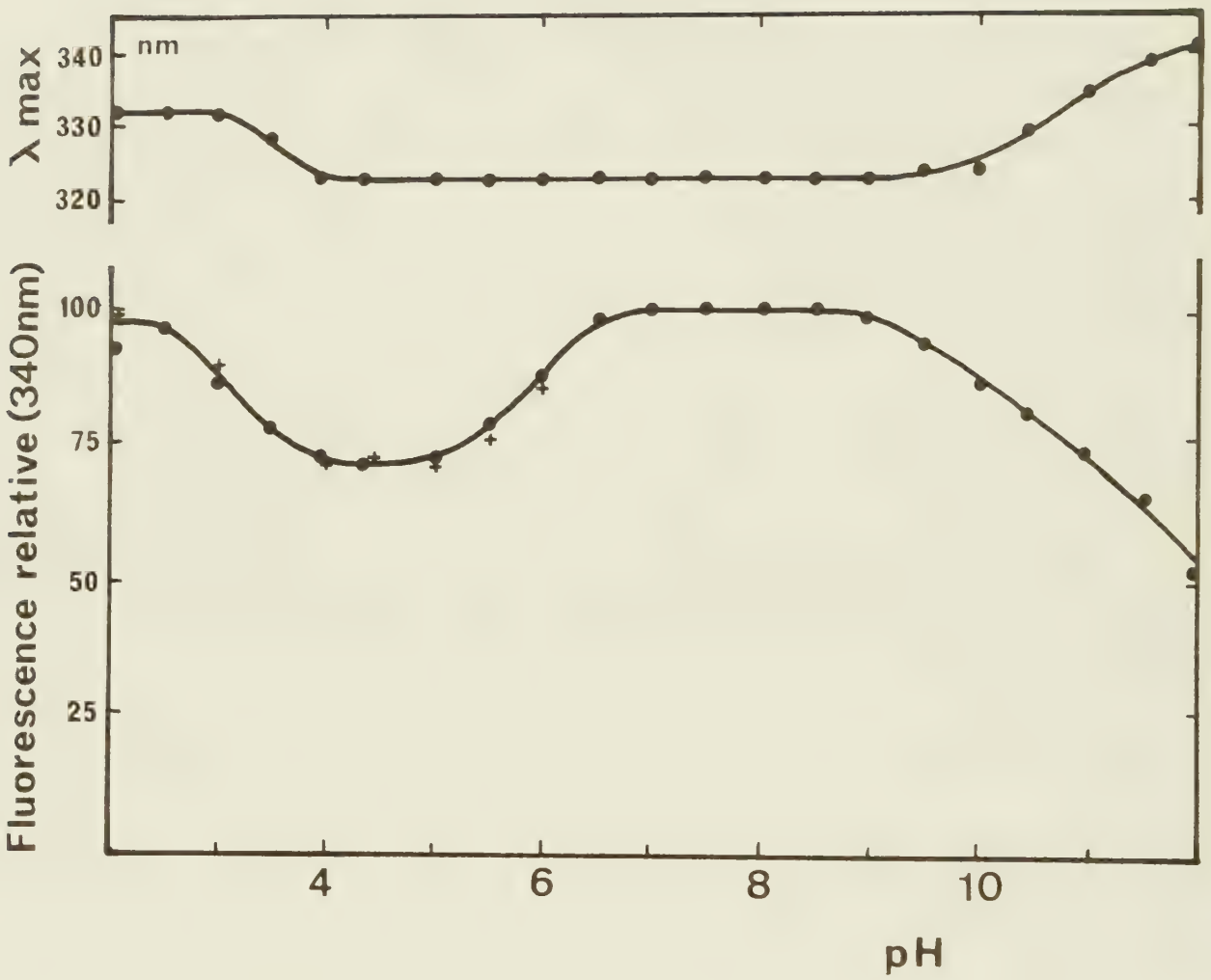
Comme en dichroïsme circulaire une modification analogue, fonction de la température, est observée en fluorescence pour les protéines de Bence-Jones (**181**).

La polarisation de fluorescence du complexe α_2-MG-DNS est légèrement abaissée avec l'augmentation du pH (Fig. **18**) ; le temps de relaxation ρ_h déterminé par l'équation de Perrin à pH 9 est d'ailleurs pratiquement identique à celui déterminé à pH 7 (§ 2.1.4) indiquant, comme à ce pH, une grande flexibilité de la molécule d'α_2-MG.

L'augmentation de la polarisation avec l'abaissement du pH est au contraire très importante (Fig. **18**) ; la valeur de la polarisation à pH 2, égale à 0.295, est remarquablement élevée. Ce changement ne peut être attribué à une aggrégation de la protéine car il n'est pas dépendant de la concentration, est réversible à partir de pH 3 (Fig.**19a**) et pratiquement instantané et stable pendant plus de 3 heures à ce pH (Fig.**19b**) ; il est d'autre part indépendant du rapport DNS/α_2-MG utilisé au cours de la dansylation (0.5 ou 1.5 %).

Cette augmentation de la polarisation doit correspondre à une augmentation de la rigidité de la molécule, plutôt surprenante avec l'abaissement du pH et qui devrait être confirmée par détermination du temps de relaxation ρ_h et du rapport ρ_h/ρ_o à bas pH. Cette observation doit être rapprochée du réarrangement moléculaire, mais non de la dénaturation, observé par le déplacement du maximum d'émission de fluorescence de l'α_2-MG à bas pH.

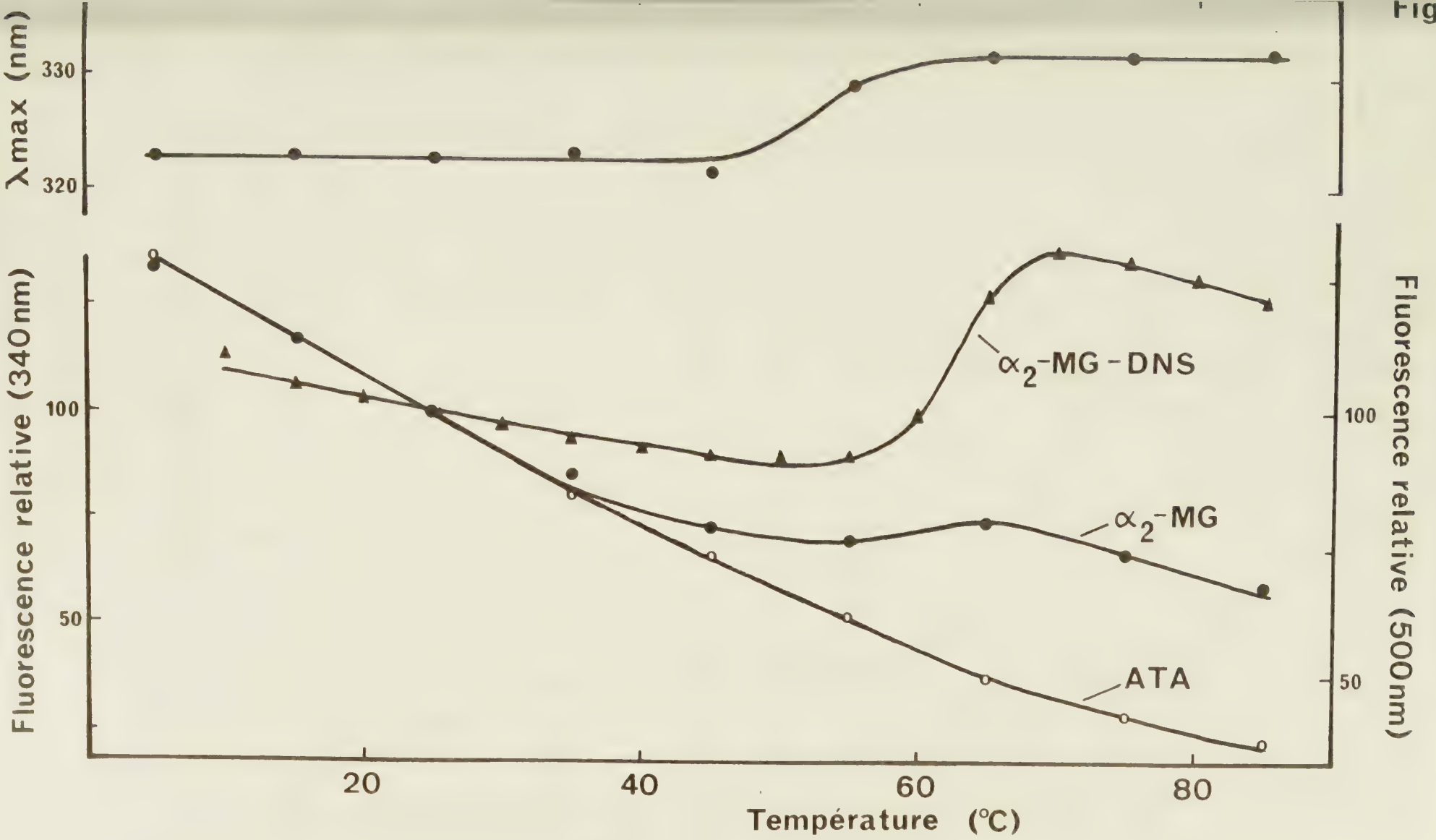
Fig. 16



Effet du pH sur l'émission de fluorescence de l'α_2-Macroglobuline humaine.

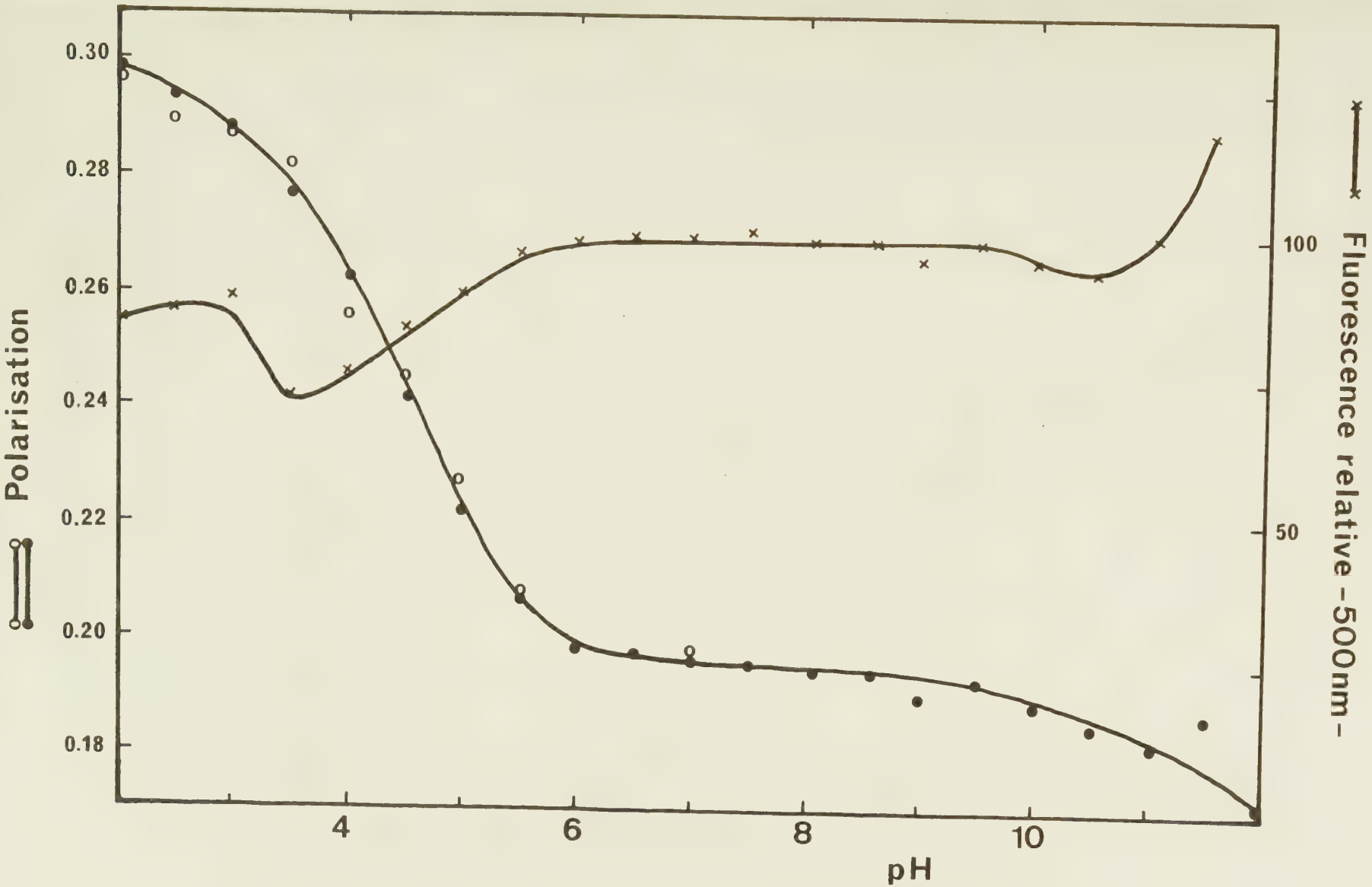
Phosphate de sodium 0.01M, 25°C, excitation à 280 nm

- ● α_2-MG 0.14 mg/ml
- \+ α_2-MG 0.014 mg/ml



Effet de la température sur la fluorescence de l'α_2-MG (0.14 mg/ml), de la N-acétyl-tryptophanamide (phosphate de sodium 0.01M, pH 7.0, excitation à 280 nm) et sur la fluorescence du complexe α_2-MG-DNS (phosphate de sodium 0.02M, NaCl 0.15M, pH 7.0, excitation à 340 nm).

Fig. 18

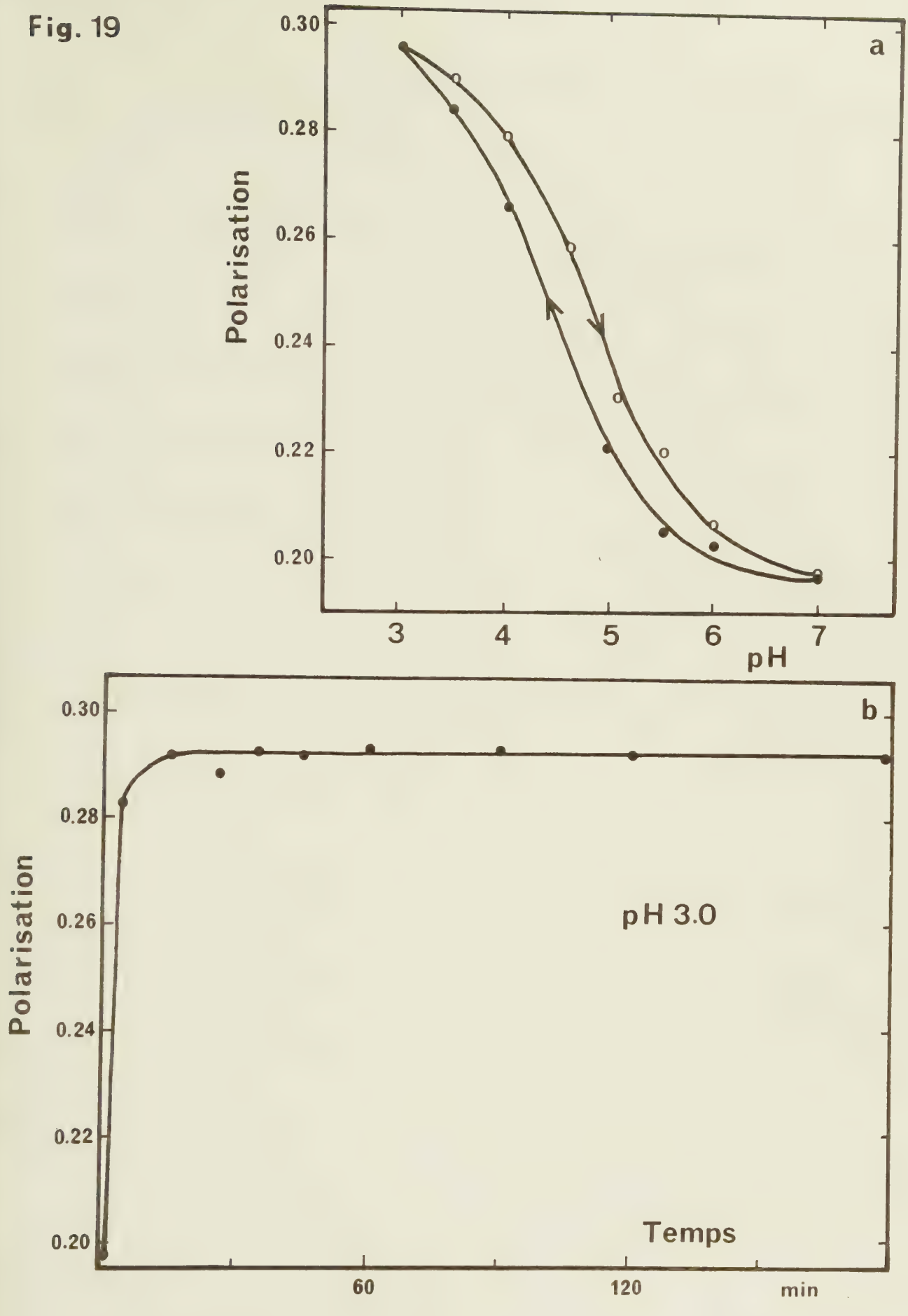


Effet du pH sur la polarisation de fluorescence du complexe α_2-MG-DNS

Phosphate de sodium 0.01M, NaCl 0.15M, 25°C
Excitation à 340 nm, émission à 500 nm.

- ● α_2-MG-DNS 0.05 mg/ml
- o α_2-MG-DNS 0.01 mg/ml

Fig. 19



Effet du pH sur la polarisation de fluorescence du complexe α_2-MG-DNS (25°C) 0.05 mg/ml.

a - Réversibilité
b - Stabilité en fonction du temps (pH 3.0)

3.2.4 - RESUME DES EFFETS DU pH ET DE LA TEMPERATURE

En résumé, une augmentation du pH au delà de 10 induit une dénaturation de l'α_2-MG, comme observé par dichroïsme circulaire et par le déplacement de la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence de l'α_2-MG.

Un abaissement du pH ne modifie pas la structure secondaire de la protéine et induit, non une dénaturation, mais un réarrangement moléculaire (λ max fluorescence), qui correspondrait à un repliement de la molécule (polarisation de fluorescence).

Aucune modification n'est observée par élévation de la température jusqu'environ 55°C. Au delà, une très nette transition observée en fluorescence (structure tertiaire) se traduit également en dichroïsme circulaire par une modification de la structure secondaire dans le sens d'une augmentation du pourcentage de structure ordonnée (feuillet β-plissé).

4 - STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L' α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUS-UNITE

Les études sur la dissociation de 1' α_2-MG ont été jusqu'à présent très limitées. SCHÖNENBERGER et al.(**97**), SCHULTZE et al.(**101**) ont envisagé une séparation sous l'influence de l'urée, et ISLIKER (**102**) a montré que cette séparation est accentuée par réduction de la protéine. Ainsi, seules des études de 1' α_2-MG dans l'urée ont été effectuées et aucune sous-unité n'a été isolée ; il apparaissait nécessaire d'élargir les études sur la dissociation de cette protéine.

4.1 DISSOCIATION DE L' α_2-MG

Les recherches sur la structure en sous-unités d'une protéine sont généralement effectuées en la soumettant à l'action d'agents dénaturants tels l'urée, le chlorhydrate de guanidine, le dodécyl sulfate de sodium à différentes molarités. La protéine dissociée est ensuite étudiée par des techniques physiques, ultracentrifugation, électrophorèse, filtration en gel, qui permettent de déterminer les modifications de poids moléculaire provoquées par les agents dénaturants.

4.1.1 - ELECTROPHORESE EN GEL

L' α_2-MG dissociée, mais non réduite, migre peu en électrophorèse en gel d'amidon dans l'urée, ou est souvent insolubilisée dans le gel.
En gel de polyacrylamide à 4 % dans l'urée à pH 3.3, ou dans le SDS à pH 8.6 après incubation dans le chlorhydrate de guanidine, la migration est faible (Fig.**20**). Il est donc très difficile de déceler dans ces conditions des produits de dissociation.

4.1.2 - FILTRATION EN GEL

La filtration de 1' α_2-MG, préalablement incubée 48 heures avec l'agent dénaturant, sur des colonnes de Séphadex G-150, G-200, et même de Biogel A-5m (6 % d'agarose) équilibrées dans l'urée 5 M ou 8 M, le SDS à 2 % ou le chlorhydrate de guanidine 5.2 M, ne fait apparaître qu'un seul pic (Fig. **20**) exclu de la colonne au même volume que le bleu dextran témoin, dont le poids moléculaire élevé permet de mesurer le volume d'exclusion du gel (densité optique à 630 nm).

Ces résultats, en contradiction apparente avec ceux de l'ultracentrifugation, peuvent être expliqués par l'abaissement très net du pouvoir de résolution des gels employés, pour les composés de poids moléculaire élevé, en présence d'urée ou de guanidine ; ainsi, le Biogel A-5 m dans le chlorhydrate de guanidine 6 M exclut tous les composés de poids moléculaires supérieurs à 100 000 (**184**).

4.1.3 - FLUORESCENCE

Le pic d'émission de fluorescence de l' α_2-MG humaine (Fig.**13**) a son maximum à 343 nm, lorsque la molécule est excitée à 280 nm, en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M. La position de ce maximum correspond à celui des spectres des peptides à tryptophane en solution aqueuse indiquant un déplissement complet de la molécule et une exposition des résidus tryptophane. Un épaulement du spectre à 305 nm est dû à la fluorescence des résidus tyrosine.

4.1.4 - ULTRACENTRIFUGATION

Les résultats de l'ultracentrifugation, rapportés dans le tableau **VIII**, suggèrent que l' α_2-MG subit une dissociation plus ou moins importante selon l'agent dénaturant.

- Dans l'urée, il apparaît que l'emploi de ce dénaturant à la molarité 5 M est insuffisant pour effectuer une dissociation complète de la molécule, dissociation qui ne semble pas non plus réalisée en présence d'urée 8 M ; dans ce dernier cas, une hétérogénéité est observée pour les différents coefficients de sédimentation.

- Dans le SDS à 2 %, des constituants de faibles coefficients de sédimentation sont présents, mais une interprétation est délicate pour deux raisons (**185**) : . la flottabilité du complexe protéine-SDS est augmentée, par rapport à celle de la protéine seule, car le volume partiel spécifique du SDS ($\bar{v}$ = 0.876) est supérieur à celui des protéines.

. le poids moléculaire du complexe est lui-même modifié en raison de la fixation d'un pourcentage important de SDS à la protéine (**186,187**).

- Dans le chlorhydrate de guanidine, la dissociation apparaît totale à la molarité 5.2 M. Alors que le $S^0_{20,w}$ déterminé pour l' α_2-MG native est compris entre 18 et 20 S (**97** , **98**), le S^0_{20} déterminé dans le chlorhydrate de guanidine 5.2 M (Fig.**24**) est égal à 2.19 S, ce qui après correction pour la densité (1.1430) et la viscosité (1.5619) du solvant employé, donne une valeur :

$$S^0_{20,w} = 5.4 \text{ S}$$

Le coefficient de correction, 2.476, employé pour ce solvant, avec $\bar{v} = 0.720$, est proche de celui utilisé au cours des études de dissociation de la met-hémoglobine par KAWAHARA et al. (**188**).

La préparation d' α_2-MG dans le chlorhydrate de guanidine contient un faible pourcentage (6 %) d'un constituant de coefficient de sédimentation $S^0_{20} = 3.06$ S (Fig. **24**) plus élevé que celui de constituant principal ; en raison de son peu d'importance il n'en sera pas tenu compte.

A quoi correspondent ces constituants observés en présence d'agents dénaturants et en particulier, ce produit de coefficient de sédimentation à dilution infinie 2.19 S dans la guanidine qui, après correction pour la densité et la viscosité du solvant, donne un $S^0_{20,w} = 5.4$ S ? Est-il possible de relier ce 5.4 S aux 1/2 molécules 11-12 S mises en évidence par GENTOU (**100**) ? Ces constituants marquent-ils la limite de dissociation de la molécule ?

Si l'hypothèse de la rupture de liaisons covalentes intercaténaires différentes des liaisons peptidiques par le chlorhydrate de guanidine (**189**) est peu crédible et n'a pas été vérifiée, la réponse tient vraisemblablement dans un abaissement du coefficient de sédimentation par l'agent dénaturant (hydratation préférentielle) et une réduction brutale du coefficient de diffusion, $D^0_{20,w}$ en présence d'urée ou de guanidine (**190**).

La solution est apportée par la détermination du poids moléculaire de l' α_2-MG en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M par équilibre de sédimentation à haute vitesse.

Après 60 heures de centrifugation à 10 000 rpm (Fig. **21**), le poids moléculaire (moyenne de 4 déterminations) calculé est :

$$P.M. = 370\,000 \qquad (\bar{v} = 0.720)$$

Ce résultat correspond effectivement à la 1/2 molécule et si la valeur trouvée est légèrement inférieure aux 390 000 théoriques, il est probable que la différence est due à la relative imprécision des mesures en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M.

Des positions contradictoires sont notées dans la littérature sur la valeur du volume partiel spécifique molaire en présence de chlorhydrate de guanidine. Si certains auteurs (**191-193**) considèrent que dans ces conditions $\bar{v}$ est abaissé de 0.01 par rapport à sa valeur dans l'eau ou

des solvants dilués, d'autres auteurs pensent au contraire que cette correction n'est pas obligatoire ; le volume partiel n'étant, selon eux, pas (194,195) ou très faiblement (196) abaissé par le chlorhydrate de guanidine. Dans le présent travail, c'est l'utilisation du $\bar{v}$ non modifié en présence de guanidine qui donne la valeur la plus cohérente pour le poids moléculaire de la 1/2 molécule d' α_2-MG.

Ainsi, le constituant de $S^0_{20,\mu 5.2M}$ = 2.19 S correspond au composant 11-12 S observé en absence de chlorhydrate de guanidine 5.2 M, c'est à dire à la 1/2 molécule et celle-ci constitue bien la limite de dissociation de 1' α_2-MG.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus pour une protéine de l'oeuf : l'ovomacroglobuline (197) ; de composition en aminoacides voisine de celle de 1' α_2-MG, de poids moléculaire 600 000, avec un coefficient de sédimentation $S^0_{20,w}$ de 17 S, ne fixant apparemment pas la trypsine, elle n'a pu être résolue au-delà de sous-unités 10.7 S correspondant à la 1/2 molécule. Il en est de même pour la thyroglobuline : son poids moléculaire 670 000 correspond à un constituant 18 S séparable en deux sous-unités 11-12 S (198).

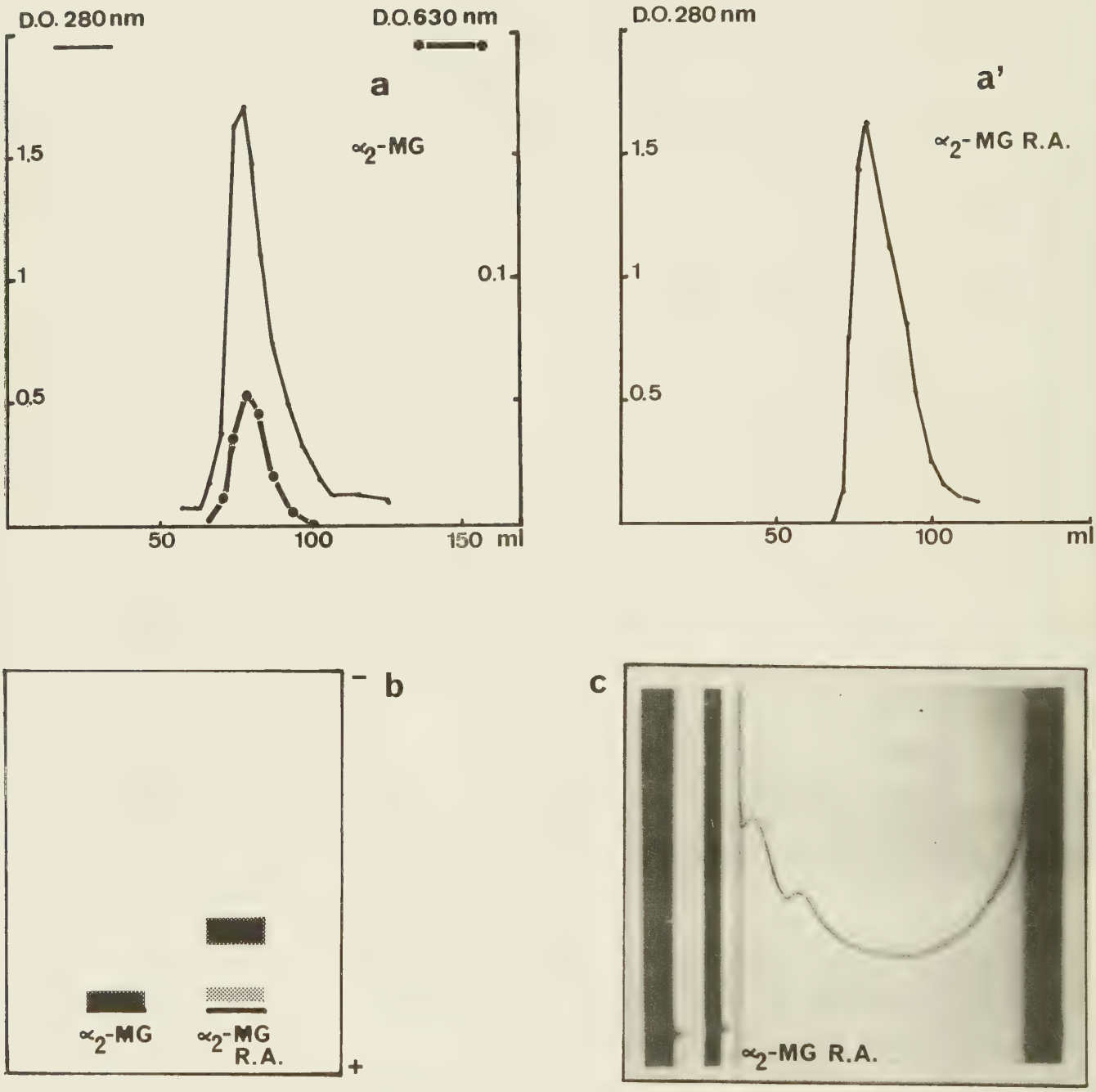
TABLEAU VIII

ULTRACENTRIFUGATION DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE DANS DIFFERENTS MILIEUX DENATURANTS

(Concentrations de 5 à 10 mg/ml)

Agent dénaturant	Coefficient de sédimentation						
Urée 5M					9.1S (30%)	11.3S (55%)	14.8S (15%)
Urée 5M (97)					- (7%)	11S (43%)	15S (50%)
Urée 8M	x (15%)	2.8S (50%)	3.6S (25%)	4.4S (10%)			
Chlorhydrate de guanidine 5.2M	1.4S (94%)	1.9S (6%)					
Chlorhydrate de guanidine 8M	1.5S (80%)	2.1S (20%)					
SDS à 2%		2.1S (75%)	3.3S (5%)	3.6S (5%)	4.2S (15%)		
α_2-MG de lapin urée 5M (104)	1.7S (+++)		3.0S (+++)		4.5S (+)		
α_2-MG réduite et alkylée, urée 5M	0.7S (+++)	2.8S (+)					

Fig. 20



Etude de la dissociation de l'α_2-MG et de l'α_2-MG réduite et alkylée (α_2-MG R.A.)

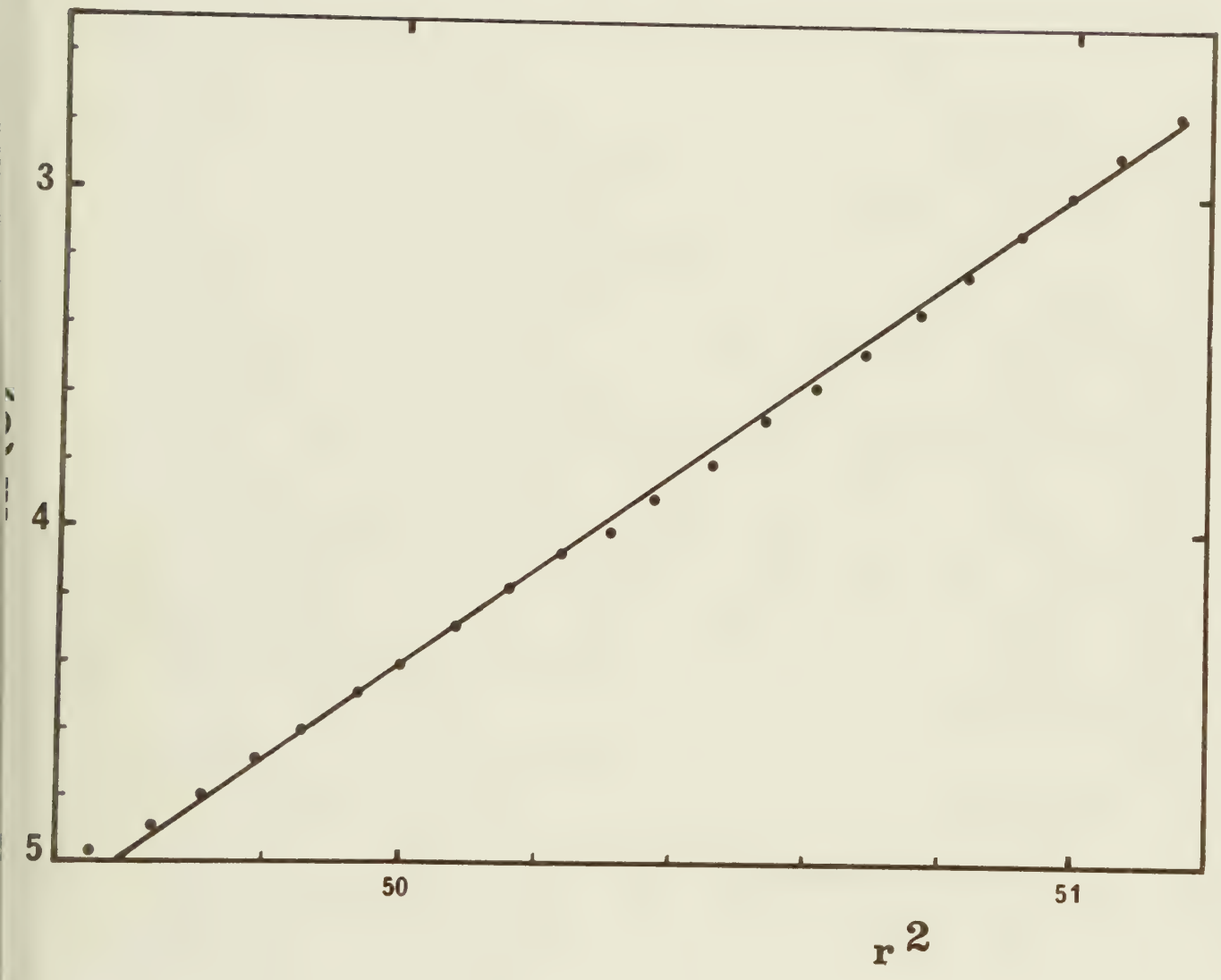
réduction-alkylation : mercaptoéthanol 0.25M, iodoacétamide 0.3M.

a-a' Filtration sur gel de Sephadex G-150 (70 x 2 cm)
tampon acéto-acétate 0.2M, urée 8M, pH 4.75.
α_2-MG : 25 mg.

b Electrophorèse en gel d'acrylamide à 4% dans l'urée, pH 3.3.

c Ultracentrifugation dans l'urée 5M (0.7S +++, 2.8S +).

Fig. 21



Equilibre de sédimentation de l'α_2-Macroglobuline humaine en présence de chlorhydrate de guanidine 6M dans le tampon Tris-HCl 0.01M, pH 8.5, 10000 rpm. Ultracentifugeuse modèle E, optique d'absorption.
Le logarithme négatif de la concentration protéique (-ln C) en g/100 ml est porté en fonction du carré du rayon par rapport à l'axe de rotation (r^2).

4.2 - REDUCTION-ALKYLATION DE L'α_2-MG (Lot X_a)

La demi-molécule (11-12 S) constituant la limite de dissociation de l'α_2-MG par rupture des liaisons non covalentes, la protéine a été soumise à la réduction-alkylation afin de déterminer s'il existe des sous-unités liées par d'autres liaisons, et en particulier par des ponts disulfures.

Alors que l'électrophorèse en gel d'amidon dans l'urée selon POULIK (**103**) montrait huit bandes protéiques pour l'α_2-MG réduite et alkylée, la protéine réduite et alkylée selon la même technique est, comme la protéine non réduite, exclue du Sephadex G-150 dans l'urée 5M ou 8M avec le bleu dextran (Fig. **20**). Des résultats identiques sont obtenus avec des colonnes de Sephadex G-150 dans le SDS à 2 % ou dans le chlorhydrate de guanidine 5.2 M. Ainsi, malgré la dissociation apparente dans l'urée, il n'est pas possible d'isoler les sous-unités.

Les résultats diffèrent en électrophorèse en gel de polyacrylamide à 4 % dans l'urée à pH 3.3 (Fig.**20**) avec seulement apparition de deux bandes de faible mobilité, la plus rapide étant la plus importante (environ 80 %) ; ce résultat est à rapprocher de la présence de deux constituants 0.7 S (+++) et 2.8 S (+) révélés par ultracentrifugation de la protéine réduite et alkylée dans l'urée 5 M (Fig. **20**).

En gel filtration sur Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine 5.2 M, l'α_2-MG native est exclue avec le bleu dextran, tandis que l'α_2-MG réduite par le dithiothréitol 0.1 M et alkylée par l'iodo-acétamide 0.3 M dans la guanidine est résolue en deux pics (Fig. **22**). Le premier pic est exclu tandis que le second pic, nettement plus important est retardé.

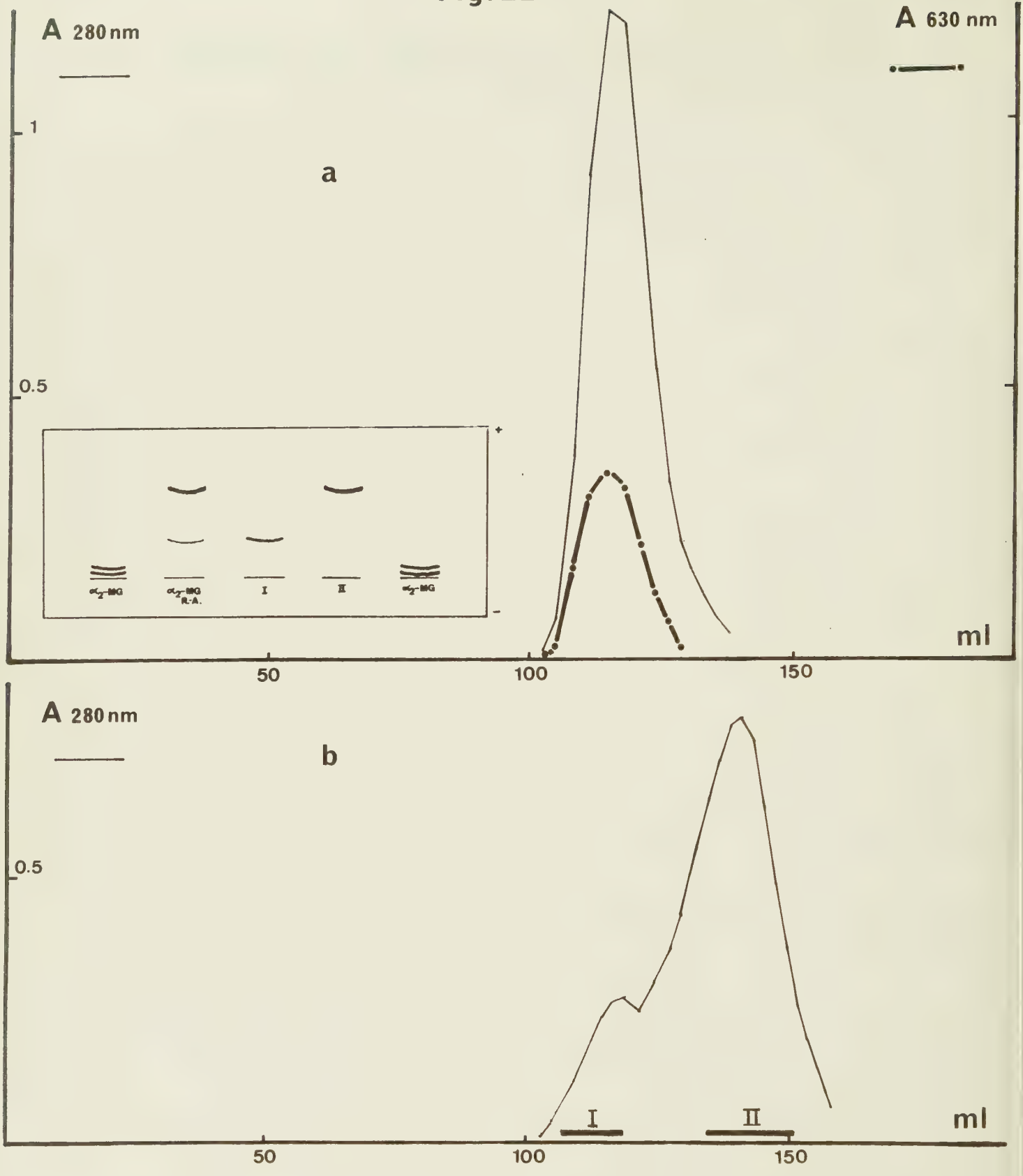
L'α_2-MG ainsi traitée fait apparaître 2 bandes en électrophorèse en gel de polyacrylamide à 4 %, pH 8.6, dans le SDS, chacune de ces bandes correspondant aux deux pics séparés (Fig. **22**).

Il apparaît donc que la réduction suivie d'alkylation de l'α_2-MG humaine a permis la dissociation de cette protéine en deux fractions : la fraction I qui diffère de l'α_2-MG native par sa migration en électrophorèse en gel de polyacrylamide et la fraction II, plus importante quantitativement (environ 80-85 %) mais de plus faible poids moléculaire.

Une expérience complémentaire de cochromatographie, α_2-MG réduite et alkylée et α_2-MG non réduite, met en évidence le rapport pondéral de ces deux fractions ; le premier pic devient le plus important car il contient la fraction I et le 11 S formé par dissociation de l'α_2-MG totale, comme

indiqué par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS (Fig. **23**), alors que le second ne contient que la fraction II.

Fig. 22

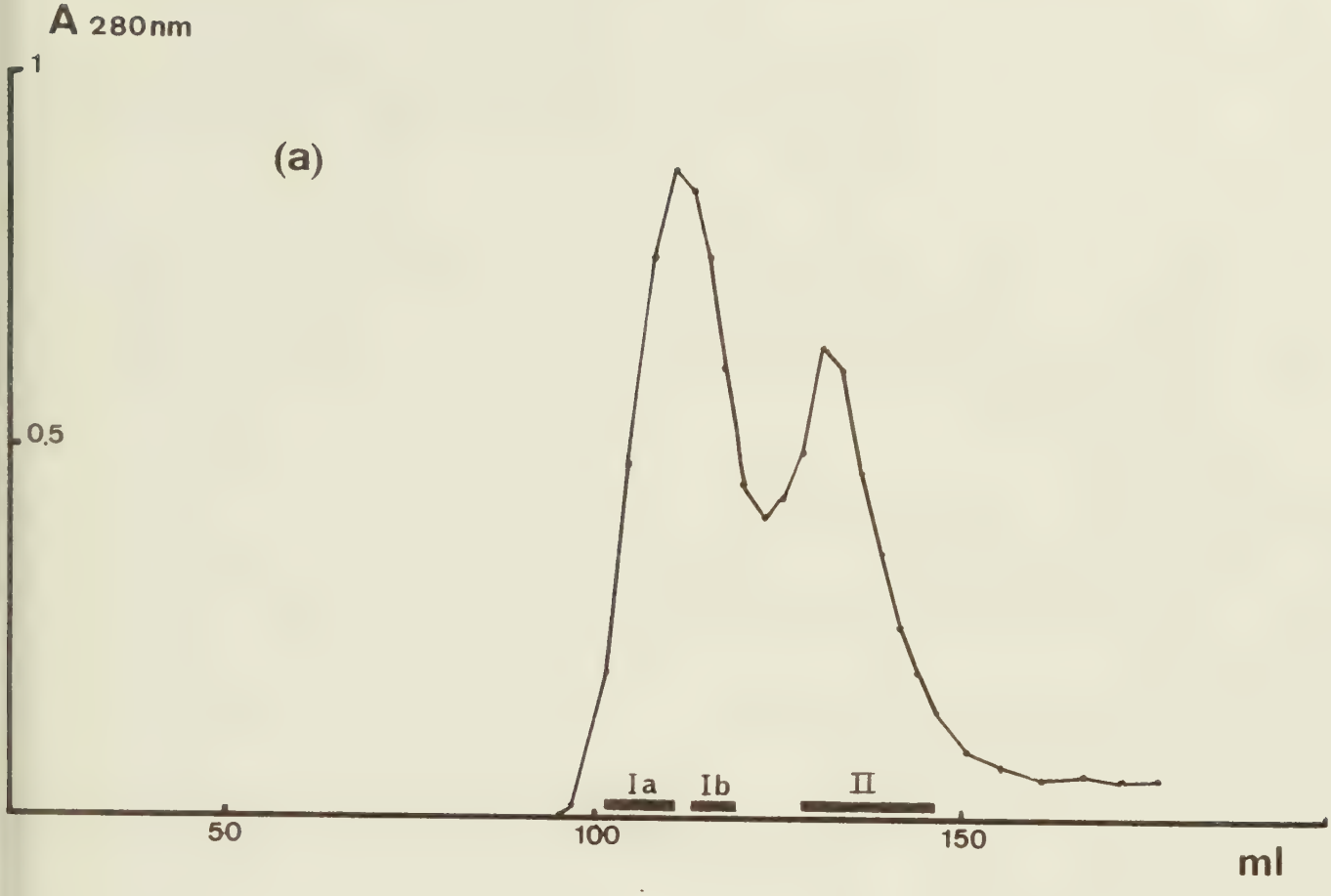


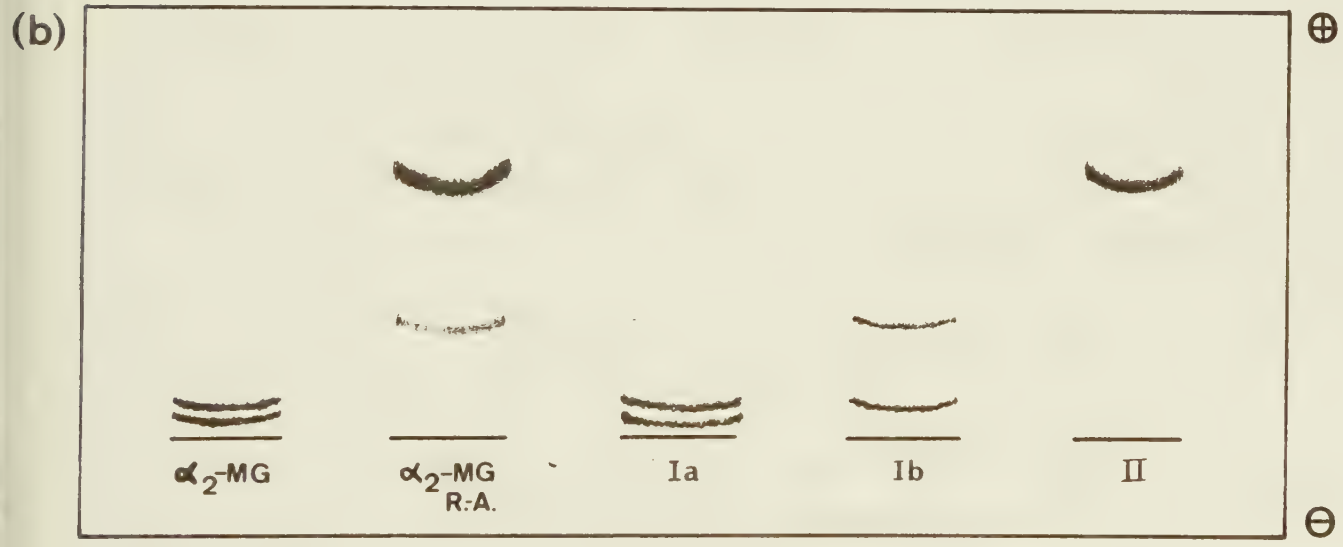
Gel-filtration sur Sephadex G-200 (85 x 2 cm) dans le tampon phosphate de sodium mono/disodique 0.06M, EDTA 5.10^{-3}M, chlorhydrate de guanidine 5.2M, pH 5.9 de :

a - 30 mg d'α_2-MG + bleu dextran (A 630 nm).
b - 30 mg d'α_2-MG réduite et alkylée (dithiothréitol 0.1M, iodoacétamide 0.3M).

Electrophorèse en gel d'acrylamide à 4% dans le SDS des fractions obtenues.

Fig. 23





(a) Cochromatographie sur colonne de Sephadex G-200 (85 x 2 cm) équilibrée dans le tampon phosphate mono/disodique 0.06M, chlorhydrate de guanidine 5.2M, EDTA 5.10^{-3}M, pH 5.9, de 15 mg d'α_2-MG dénaturée et de 15 mg d'α_2-MG réduite et alkylée.

(b) Electrophorèse en gel d'acrylamide dans le SDS des différentes fractions (tampon Tris-HCl 0.05M, SDS 0.2%, pH 8.6, 90 min., 400 V).

4.3 - CARACTERISATION DES FRACTIONS I ET II ISOLEES APRES REDUCTION-ALKYLATION DE L' α_2-MG.

En électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS, les fractions I et II sont homogènes et identifiables aux deux bandes observées avec l' α_2-M réduite et alkylée (Fig.**22**).

En ultracentrifugation dans le chlorhydrate de guanidine 5.2 M (Fig.**24**), à pH 5.90, les deux fractions apparaissent homogènes sous forme de pics uniques et symétriques. Aussi ces deux fractions obtenues par filtration sur Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine ont-elles été caractérisées.

4.3.1 - MOBILITE ELECTROPHORETIQUE

En électrophorèse sur papier, à pH 8.6, la fraction II migre sous forme d'une bande homogène dans la zone des α_2-β globulines.

4.3.2 - CARACTERISATION IMMUNOLOGIQUE

La solubilité des fractions I et II est faible en l'absence d'agents dissociants, il est cependant possible d'obtenir une solubilisation avec le tampon véronal-HCl 0.1 M, pH 8.6, après passage par des pH extrêmes (acide acétique M ou soude 0.02 N).

En immunoélectrophorèse et immunodiffusion contre un antisérum de lapin spécifique anti-α_2-MG humaine, aucune réaction n'a paru exister à pH 4.7 et 8.6.

Un antisérum de lapin a été préparé contre la fraction II. Il réagit avec II, avec l' α_2-MG et aussi plus faiblement avec I, ces 3 composés présentent une identité totale.

4.3.3 - COMPOSITION CHIMIQUE

Les analyses des constituants glucidiques et des aminoacides, après 16 heures d'hydrolyse sous vide par 6N HCl, à 100°C, sont rapportées dans

le tableau IX .

Les fractions I et II ont une composition très semblable à celle de l'α_2-MG totale. Les résultats obtenus pour l' α_2-MG sont en accord avec ceux publiés dans la littérature (**83,85**).

4.3.4 - EXTREMITES TERMINALES

- La détermination des groupements N-terminaux, par la méthode de SANGER, permet d 'identifier les mêmes DNP-aminoacides pour la fraction II et l' α_2-MG
Ce sont : sérine, valine, acide aspartique (acide glutamique) et, à un degré moindre, thréonine, lysine et alanine.
Les résultats sont confirmés par dansylation de la protéine dénaturée qui permet en outre d'observer des traces de glycine.
La présence possible d'aminoacides libres dans le milieu a été éliminée.

- Une cinétique de la libération des aminoacides, de l'α_2-MG et de la fraction II, par la carboxypeptidase A est effectuée à 37°C, avec un rapport enzyme/substrat égal à 1/100.
Dans ces conditions, les deux cinétiques sont absolument identiques, les protéines libèrent plusieurs aminoacides en quantité supérieure à une mole/mole d' α_2-MG, après 2 heures d'hydrolyse enzymatique.

Thréonine	5 moles/mole
Leucine	3 " "
Sérine, Glycine	2 " "
Alanine, Valine, Phénylalanine, Tyrosine	1 " "

Une cinétique effectuée sur l'α_2-MG, à 25°C, libère les mêmes aminoacides dans des rapports semblables.

4.3.5 - POIDS MOLECULAIRE

Deux bandes sont observées en électrophorèse en gel d'acrylamide à 4 % dans le SDS pour la préparation d' α_2-MG humaine, après incubation en présence de SDS et de mercaptoéthanol (Fig. **22**).

- la plus rapide, la plus importante (80-85 %) migre sensiblement au niveau de la transferrine humaine : fraction II.

- la seconde migre au niveau du dimère de la transferrine : fraction I.

La migration de différentes protéines témoins, de poids moléculaire connu,

hémoglobine, chaines L et H des immunoglobulines, albumine, transferrine, traitées dans les mêmes conditions que l'α_2-MG permet de déterminer le poids moléculaire des deux fractions par référence à la courbe (Fig.**25**).

log (poids moléculaire) = f (mobilité électrophorétique)

Fraction I P.M. = 190 000 ± 15000
Fraction II P.M. = 83 000 ± 7000

Les coefficients de sédimentation à 20°C des fractions isolées, dans le chlorhydrate de guanidine 5.2M, sont respectivement :

Fraction I $s_{20}^{0.54\%} = 0.93S$

Fraction II $s_{20}^{0.54\%} = 0.65S$

$s_{20}^{0} = 0.91S$

Ce dernier coefficient de sédimentation, de la fraction II dans le chlorhydrate de guanidine, après correction pour la densité et la viscosité, est relativement faible et égal à :

$$s_{20,w}^{0} = 2.25S$$

TANFORD (**199**) admettant pour une protéine dénaturée, de poids moléculaire 85 000, ponts disulfures réduits, un coefficient de sédimentation s_{20}^{0} voisin de 1.0S dans la guanidine, ce résultat correspond au poids moléculaire déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS.

L'α_2-MG réduite et alkylée a été filtrée sur Biogel A5m dans les mêmes conditions que sur Sephadex G-200. Le profil observé est voisin (**148**) mais pour la détermination du poids moléculaire, il est assez difficile de se rapporter aux graphiques témoins établis par FISH et al. (**184**) par gel-filtration de protéines réduites sur ce support.

En effet, la différence de molarité utilisée en guanidine, 5.2M au lieu de 6M, intervient vraisemblablement beaucoup dans la zone de poids moléculaires élevés où le pouvoir de résolution du gel est le plus faible et la courbe d'étalonnage la moins précise.
Par contre, lors de l'étude des sous-unités de la thyroglobuline, LISSITZKY et al. (**200**) ont utilisé le Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine 5M ; ils ont déterminé le rapport Ve/Vo (volume d'élution/volume d'exclusion) correspondant à différentes protéines réduites. Pour une sous-unité de 80 000, Ve/Vo = 1.18 - 1.19, pour le sérum albumine (68 000), Ve/Vo = 1.26. Le rapport Ve/Vo trouvé pour la fraction II de l'α_2-MG est, dans ces conditions, rigoureusement constant et compris entre 1.19 et 1.20 ; le poids moléculaire de la fraction II serait donc voisin de 80 000.

Une détermination du poids moléculaire de la fraction II a été effectuée par équilibre de sédimentation à haute vitesse en présence de chlorhydrate de guanidine 5.2M, avec l'ultracentrifugeuse L2 65B équipée d'une optique Schlieren. Après 24 heures de centrifugation à 28400 rpm et 20°C, le poids moléculaire calculé est :

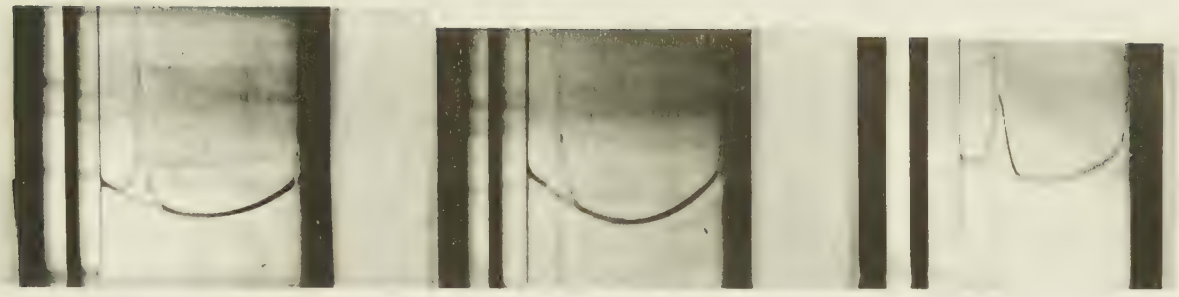
$$P.M. = 76\,500 \qquad (\bar{v} = 0.720)$$

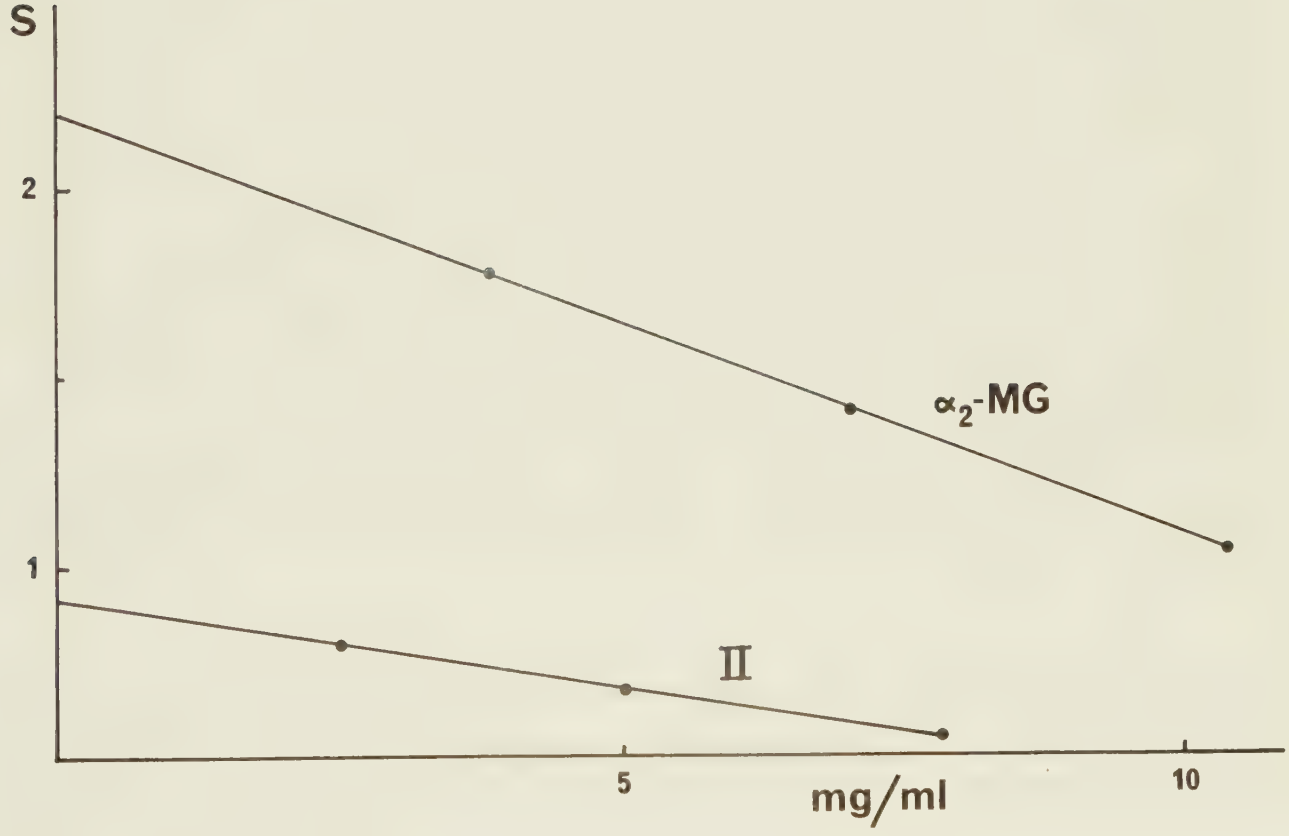
Ce poids moléculaire doit être considéré avec précaution car - il est le résultat d'une seule détermination, - l'équilibre n'est pas nécessairement atteint après 24 heures (cf § 4.1.4), - la courbe $y/r = f(S)$ n'est pas une droite parfaite.

TABLEAU IX COMPOSITION EN AMINOACIDES ET EN GLUCIDES DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE ET DES FRACTIONS OBTENUES APRES REDUCTION-ALKYLATION (g/100g de protéine)

Aminoacide	α_2-MG (85)	α_2-MG (83)	α_2-MG	Fraction I	Fraction I
Acide aspartique	7,16	7,24	7,58	7,49	7,46
Thréonine	5,35	5,47	5,59	6,14	5,51
Sérine	5,50	5,35	5,94	5,61	5,40
Acide glutamique	12,30	12,60	13,45	13,60	13,67
Proline	4,07	4,21	3,84	4,22	3,56
Glycine	2,75	2,77	2,87	3,07	3,17
Alanine	3,44	3,49	3,51	3,68	3,45
Valine	6,80	6,98	6,17	5,71	6,38
Isoleucine	3,09	3,26	3,12	3,16	3,12
Leucine	7,76	8,09	7,66	7,69	7,41
Tyrosine	4,84	4,76	5,02	4,88	4,66
Phénylalanine	5,37	4,96	4,81	4,62	4,86
Lysine	5,34	6,47	5,48	5,42	5,72
Histidine	2,70	3,03	2,89	2,92	2,80
Arginine	3,82	4,27	3,68	4,31	3,78
Méthionine	1,53	1,71	1,66	0,81	1,04
Cystéine	1,14	1,58	2,17	0	0
N-acétyl-glucosamine	3,65	3,94	4,25	4,18	4,45
Hexoses	3,6	3,43	4,6	4,2	5,4

Fig. 24



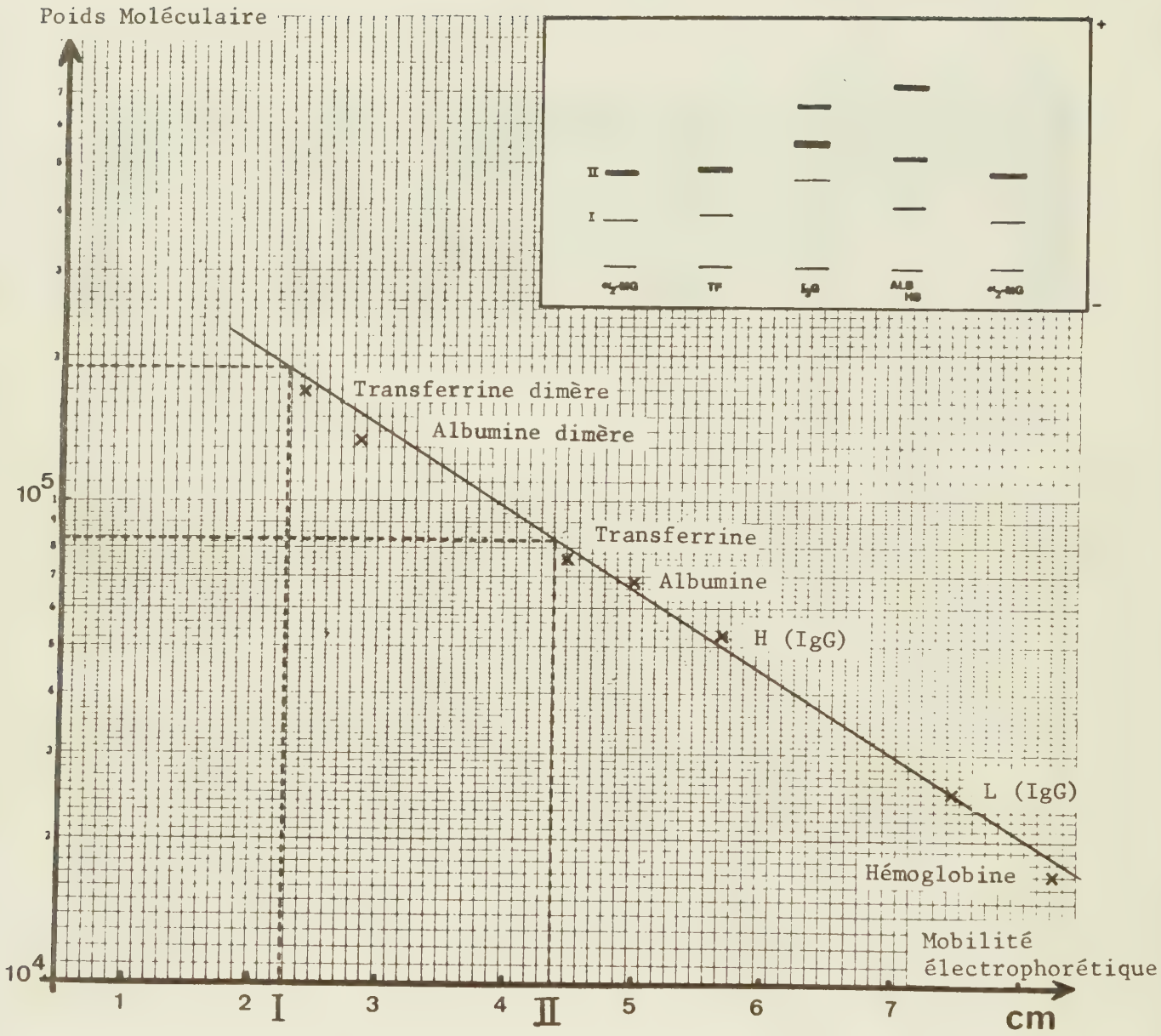


Ultracentrifugation de l'α_2-MG et des fractions I et II en présence de chlorhydrate de guanidine 5.2M.

Détermination du coefficient de sédimentation à dilution infinie (s^0_{20}) de l'α_2-MG et de la fraction II.

Tampon phosphate de sodium 0.06M, chlorhydrate de guanidine 5.2M, EDTA 5.10^{-3} M, pH 5.90.

Fig. 25



Estimation du Poids Moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide dans le SDS.

La courbe représente le logarithme du Poids Moléculaire en fonction de la mobilité électrophorétique des protéines témoins.

Hémoglobine	=	17.000
L (IgG)	=	25.000
H (IgG)	=	53.000
Albumine	=	68.000
Transferrine	=	76.000

4.4 - DISCUSSION

Par réduction-alkylation et filtration sur Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine, deux fractions ont été isolées à partir de l'α_2-MG humaine.

Leurs coefficients de sédimentation en présence de chlorhydrate de guanidine sont nettement inférieurs à ceux observés pour la protéine dans ces conditions, mais il est très difficile de relier le s^0_{20} au poids moléculaire (cf. § 4.1.4).Des résultats souvent très différents ont été rapportés dans la littérature (tableau **X**) et l'application de la relation empirique $s^0 = 0.286\ (1 - \bar{v}\rho)n^{0.473}$, déterminée par TANFORD et al.(**201**), donne pour la fraction II un nombre n, de résidus sous forme "random coil" égal à 449, ce qui pour un poids moléculaire moyen par résidu de 117.2 indiquerait une chaîne peptidique de 53000! Il faut toutefois être prudent quant à l'application de cette formule, car si elle a bien été déterminée pour des protéines réduites, c'est en présence de chlorhydrate de guanidine 6M, et comme elle ne tient compte que de la partie peptidique, il n'est pas possible d'affirmer qu'elle s'applique correctement aux glycoprotéines.

Le poids moléculaire déterminé par gel-filtration semble acceptable. En effet, si le volume d'élution en gel-filtration dépend de la taille et de la forme des particules, ces effets sont caractérisés par un seul paramètre, le rayon de Stokes (R_S). Pour les protéines réduites dans un solvant tel le chlorhydrate de guanidine, leurs propriétés hydrodynamiques ne deviennent fonction que du poids moléculaire et R_S varie parallèlement à ce dernier (**202,203**).

En ce qui concerne la détermination du poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS, la méthode présente des limites (**204**) , certains auteurs ont contesté la reproductibilité des résultats (**205**) et quelques protéines se comportent anormalement dans ce système en raison de fixations variables de SDS (**206**). De plus, des réserves ont été formulées par les auteurs de la technique quant à la résolution des hétéroprotéines (**121**) ; la méthode semble toutefois donner d'excellents résultats avec les glycoprotéines : l'α_1-glycoprotéine acide (orosomucoïde) qui contient 40% de glucides a son poids moléculaire très correctement déterminé par ce moyen, comme l'ovomucoïde, 25% de glucides (**207**).

Le dernier reproche fait à ce système peut être un manque de précision attribuable à une dénaturation incomplète (**208**) ; les limites de validité de la technique restent néanmoins très correctes et le poids moléculaire, déterminé pour la fraction II, est en parfait accord avec celui trouvé par gel-filtration.
Aussi, le poids moléculaire des fractions I et II sera pris égal à 190 000 et 83 000 respectivement.

Il ne semble pas qu'il soit possible de résoudre cette préparation d'α_2-MG en fractions polypeptidiques de poids moléculaire inférieur à celui de la fraction II, de très sévères conditions de réduction étant utilisées, la concentration de dithiothréitol employée est 10 fois supérieure à celle utilisée pour la réduction de l'IgM.

Ces résultats permettent d'établir une hypothèse concernant la structure de l'α_2-MG.

Le poids moléculaire de la fraction I étant le double de celui de la fraction II, I étant quantitativement peu important par rapport à II et possédant une composition en aminoacides et en glucides ainsi qu'une réactivité immunologique identique à celle de II, il est raisonnable de penser que I est un produit de réduction incomplète de l'α_2-MG ou un dimère de II. La protéine serait alors composée de huit ou dix sous-unités du type II, de poids moléculaire 83 000.

Du fait de la relative imprécision des mesures de poids moléculaire, il est difficile de préciser si la protéine est composée de huit ou dix sous-unités. Il faut toutefois remarquer que huit est un nombre de sous-unités plus fréquemment trouvé pour les protéines que 10, ce chiffre a de plus l'avantage de créer une symétrie diédrale à l'intérieur du monomère 11-12S qui comprendrait 4 sous-unités.

TABLEAU X COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION DE DIFFERENTES PROTEINES EN PRESENCE DE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

Protéine	Poids moléculaire	Coefficient de sédimentation	
Thyroglobuline réduite (200) sous-unités	80 000 ou 114 000	$s^0_{20,gu6M} = 1.2S$	
	140 000	$s^0_{20,gu5M} = 2.0S$	
β-galactosidase E.coli (189) non réduite	91 000	$s^0_{20,gu6M} = 0.95S$	
Glycoprotéine de Tamm et Horsfall (209) non réduite	100 000	$s^0_{20,gu6M} = 2S$	
réduite	100 000	$s^0_{20,gu6M} = 1.70S$	
Céruloplasmine (210) réduite	122 000	$s^0_{25,gu6M} = 1.26S$	
Sérum albumine humaine (201) non réduite	68 000	$s^0_{25,gu6M} = 1.4S$	s^0 peu précis
réduite	68 000	$s^0_{25,gu6M} = 1.03S$	s^0 peu précis
Glucose-oxydase d'Aspergillus niger (211) réduite	80 000	$s^0_{25,gu6M} = 1.19S$	
Pyruvate décarboxylase de levure (212) réduite	90 000	$s^0_{20,gu6M} = 1.37S$	
Protéine réduite (199)	85 000	$s^0_{20,gu5.2M} \neq 1S$	
H-MG - fraction II (ce travail) réduite		$s^0_{20,gu5.2M} = 0.91S$	

5 - STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MACROGLOBULINE HUMAINE RELATION ENTRE LA STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MG ET SON INTERACTION AVEC LES PROTEASES.

5.1 - INTRODUCTION

Les résultats rapportés au chapitre précédent avaient soulevé plusieurs questions au cours de leur discussion (**148**).

S'il ne semblait pas qu'on puisse obtenir des fractions de poids moléculaire inférieur à celui de la fraction II pour ce lot d'α_2-MG, une explication totalement satisfaisante n'était pas fournie à l'observation par POULIK (**103**) de nombreuses bandes en électrophorèse en gel d'amidon dans l'urée de l'α_2-MG réduite et alkylée : hétérogénéité des sous-unités ou interconversion de différentes formes en équilibre comme pour l'haptoglobine (**213**). En ce qui concerne la détermination des extrémités terminales, si l'action séquentielle très rapide de la carboxypeptidase A pouvait expliquer les résidus C-terminaux, il n'en était pas de même pour les N-terminaux et s'il était possible d'évoquer l'existence d'allotypes (explication insuffisante) une aminopeptidase clivant séquentiellement la molécule d'α_2-MG dans le sérum était envisagée.

Enfin, il avait été constaté qu'après une longue incubation en présence de SDS et de mercaptoéthanol, l'α_2-MG montrait en gel une trainée de constituants de poids moléculaires entre 15 000 et 80 000; il pouvait s'agir de produits de dégradation et l'hypothèse avait été avancée que ce résultat était dû à la présence de protéases liées à la protéine et actives dans le SDS (**148**).

Peu après la publication de ces résultats (**109**) attribuant l'existence de 8-10 sous-unités à la molécule d'α_2-MG, JONES et al.(**98**), après réduction dans des conditions douces, obtenaient des fragments de poids moléculaire 196 000 correspondant au 1/4 de la molécule et à notre fraction I ; cette sous-unité conservant la spécificité immunologique de la molécule entière.

Par la suite, l'existence d'une chaîne polypeptidique de poids moléculaire 83 000 - 85 000 analogue à la fraction II que nous avions décrite, était confirmée (**99,214**).

Toutefois, alors que ROBERTS et al.(**99**) attribuaient la discordance de nos résultats avec ceux de JONES et al.(**98**) à des conditions de réduction plus ou moins sévères, HARPEL (**214**), sur la foi d'expériences en gel de

polyacrylamide en présence de SDS, avancait une autre explication : la molécule d'α_2-MG est composée de 4 sous-unités 185 000, et la fraction 83 000 - 85 000 serait un produit de clivage protéolytique de la molécule par des enzymes liées ; la formation de complexes entre les protéases, trypsine, thrombine, s'accompagnant (résultant en) d'un clivage protéolytique près du centre de la sous-unité (1/4 de la molécule), la réduction serait nécessaire pour identifier les dérivés 83 000 - 85 000. Une explication analogue a été proposée pour l'interaction entre l'α_2-MG et les collagénases (**215**).

C'est pour vérifier cette hypothèse que les expériences de réduction-alkylation de l'α_2-MG, qui avait été préparée à partir du sérum vieilli (conservé à - 17°C), ont été recommencées sur de l'α_2-MG préparée à partir de sérum frais et dont l'isolement a été effectué en présence d'inhibiteurs des protéases (cf § 1.1) ; ces expériences ont été également répétées sur des préparations effectuées à partir du plasma, la protéine n'ayant pas été en contact avec les protéases de la coagulation.

Des expériences d'incubation longues en présence de SDS et de mercapto éthanol ont été effectuées sur des préparations fraîches d'α_2-MG afin de contrôler l'existence éventuelle de produits de dégradation de la protéine et d'essayer de préciser leur origine : action chimique ou protéolytique.

5.2 - STRUCTURE SOUS-UNITAIRE DE L'α_2-MG FRAICHEMENT PREPAREE.

5.2.1 REDUCTION-ALKYLATION

L'α_2-macroglobine humaine fraîchement préparée à partir du sérum révèle essentiellement un composant de poids moléculaire 190 000 en électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS après incubation en présence de SDS et β-mercaptoéthanol ; seule une trace du composant 83 000 est identifiable sur le gel (Fig. **26**). Après réduction et alkylation, cette préparation d'α_2-MG est filtrée sur une colonne de Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine 5.2 M, pH 5.9. Un pic protéique unique et symétrique est exclu avec un Kd identique à celui du bleu dextran utilisé comme référence (Fig.**26**). Une seconde réduction-alkylation effectuée dans les mêmes conditions ne modifie pas ce résultat.

Des observations identiques sont effectuées lorsque l'α_2-MG est isolée à partir du plasma et non plus du sérum.

5.2.2 REDUCTION-ALKYLATION APRES INCUBATION AVEC LA TRYPSINE

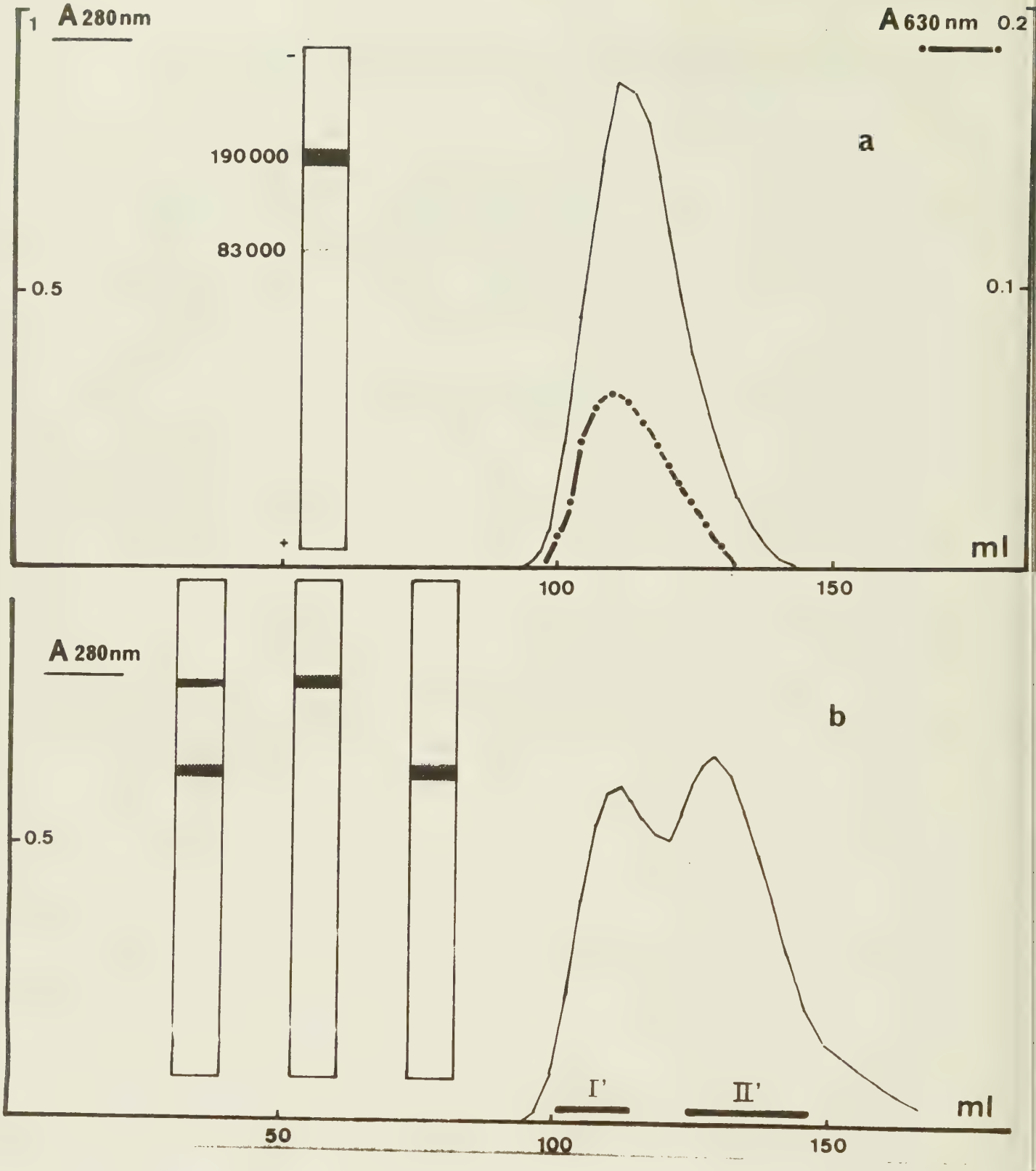
L'α_2-MG préparée à partir de sérum frais et la trypsine sont incubées dans les conditions de formation du complexe α_2-MG-trypsine, c'est à dire dans un rapport molaire 1:1, correspondant à un rapport pondéral 30:1. Après 45 minutes d'incubation à 37°C dans le tampon décrit par HARPEL (**214**), Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0, NaCl 0.85 %, citrate de sodium 0.16 %, la réaction est arrêtée par addition de chlorhydrate de guanidine.

En électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS, environ 60 % de la préparation sont constitués d'un composant de poids moléculaire 83 000 (Fig.**26**) et 40 % d'un composant de poids moléculaire 190 000.

Lorsque ce complexe est, après incubation, réduit et alkylé puis filtré sur Sephadex G-200 dans le chlorhydrate de guanidine (Fig.**26**), deux pics sont individualisés ; le premier est exclu du gel, il correspond à la fraction I, le second est retardé et son coefficient de distribution, Kd, correspond à celui de la fraction II, de poids moléculaire 83 000 précédemment décrite.

Après isolement, ces deux fractions se révèlent homogènes en électrophorèse en gel de polyacrylamide dans le SDS et correspondent aux fractions 190 000 et 83 000 (Fig. **26**).

Fig.26



a - Gel-filtration sur Sephadex G-200 (85 x 2 cm) dans le tampon phosphate mono-disodique 0.06M, chlorhydrate de guanidine 5.2M, EDTA 5 x 10^{-3}M, pH 5.90, de l'α_2-MG fraîchement préparée (30 mg) réduite et alkylée (dithiothréitol 0.1M, iodoacétamide 0.3M) + bleu dextran (A 630 nm). Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5% dans le SDS

b - Gel-filtration (même colonne) de l'α_2-MG fraîchement préparée (40 mg) réduite et alkylée après incubation avec la trypsine. Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5% dans le SDS de l'α_2-MG fraîchement préparée et incubée avec la trypsine et des fractions I' et II'isolées par gel-filtration.

5.3 - STRUCTURE SOUS UNITAIRE DES α_2-MG DE LIQUIDES PLEURAUX

La présence d' α_2-Macroglobulines liées in vivo à des protéases avait été mise en évidence dans différentes sécrétions inflammatoires tels les liquides pleuraux (**216**) ou les liquides synoviaux des arthrites rhumatoïdes (**217,218**) avec dans ce dernier cas une liaison spécifique à la collagénase. Aussi, un rôle plus précis que dans le sérum semblait pouvoir être attribué à l' α_2-MG dans les liquides inflammatoires, l'inhibition des protéases de ces sécrétions (**216**).

Il était intéressant d'examiner la structure sous-unitaire de ces α_2-MG qui avaient été en contact avec les protéases.

Trois α_2-MG isolées de liquides pleuraux ont été ainsi étudiées. Alors que leur poids moléculaire déterminé par équilibre de sédimentation est compris entre 760 000 et 810 000 après 48 heures de centrifugation, leur structure sous-unitaire est très dégradée et dans tous les cas le constituant le plus important quantitativement a un poids moléculaire 85 000 - 90 000 correspondant à la fraction II précédemment décrite.

Le profil d'électrophorèse en gel de polyacrylamide d'une de ces α_2-MG (BRA...) est rapporté dans la Fig. **27** . A côté du constituant principal 85 000 - 90 000, des constituants plus petits sont observés et seulement une très faible quantité de la fraction 180 000 - 190 000 (1/4 de la molécule).

Fig. 27

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % dans le SDS d'une α_2-Macroglobuline isolée d'un liquide pleural.

5.4 - INTERACTION "IN VIVO" ENTRE α_2-MG ET PROTEASES

Les expériences de dégradation lente de l' α_2-MG en présence de SDS et de mercaptoéthanol ont été reprises afin de préciser si elles avaient une origine chimique ou enzymatique.

5.4.1. INCUBATIONS D' α_2-MACROGLOBULINES AVEC 1 % SDS, 1 % β ME.

Quand une α_2-MG fraîchement préparée à partir du sérum est incubée avant électrophorèse en gel, différents diagrammes peuvent être observés (Fig. **28**).

Après 30 minutes d'incubation, la sous-unité 190 000 (1/4 de la molécule) est le composant le plus important accompagné du constituant 83 000 - 85 000. D'autres bandes d'intensité très faibles sont observées dont certaines de poids moléculaire élevé correspondant à l' α_2-MG non dissociée.

Avec l'allongement du temps d'incubation de 30 min à 96 h, une diminution nette de la sous-unité 190 000 est observée au profit de deux constituants de poids moléculaires 120 000 et 60 000.

Le même effet est observé, avec de légères différences, pour plusieurs α_2-MG préparées à partir du sérum.

Comme il a été suggéré que le composant isolé par réduction-alkylation de l' α_2-MG préparée à partir du sérum était du à une action protéolytique au cours de la coagulation (**214**), les mêmes expériences d'incubation en fonction du temps ont été effectuées avec la protéine préparée à partir du plasma. Dans ces conditions, une évolution similaire des diagrammes électrophorétiques en fonction du temps est observée avec même, pour la préparation concernée, une dégradation légèrement plus complète du composant 190 000.

5.4.2. INCUBATIONS DE LA TRANSFERRINE ET DE L'ALBUMINE AVEC 1 % SDS, 1 % β ME.

Afin de contrôler l'effet des réactifs utilisés sur des protéines plasmatiques, albumine et transferrine sont traitées dans les mêmes conditions que l' α_2-MG.

Aucun changement significatif des diagrammes électrophorétiques, n'est noté avec des temps d'incubation variables, même après 96 h. Ce résultat tend à exclure une réaction chimique du milieu sur les protéines et rend les observations du § 5.4.1 caractéristiques de l' α_2-MG.

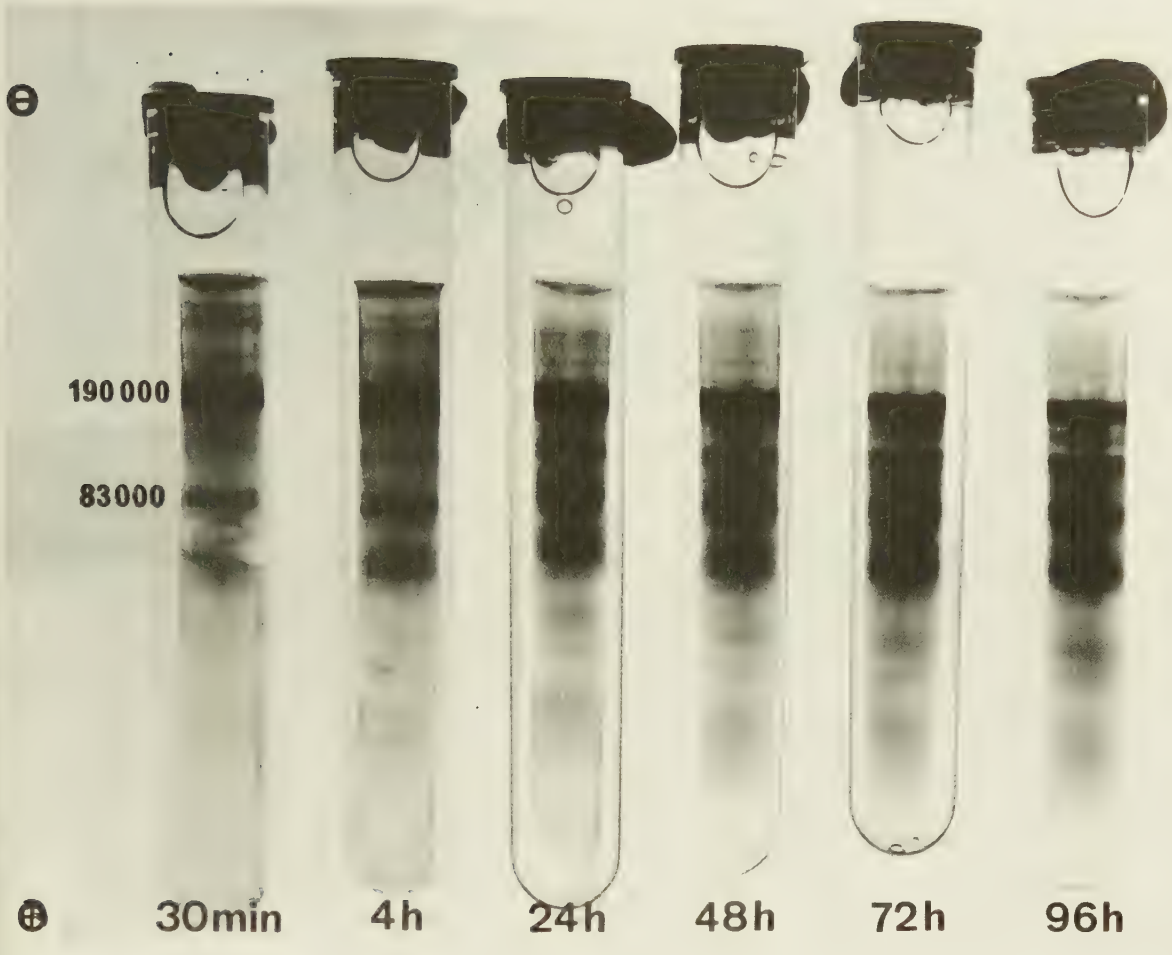
5.4.3. INCUBATIONS DE L'α_2-MG SEULE, AVEC 1 % SDS OU AVEC 1 % β ME.

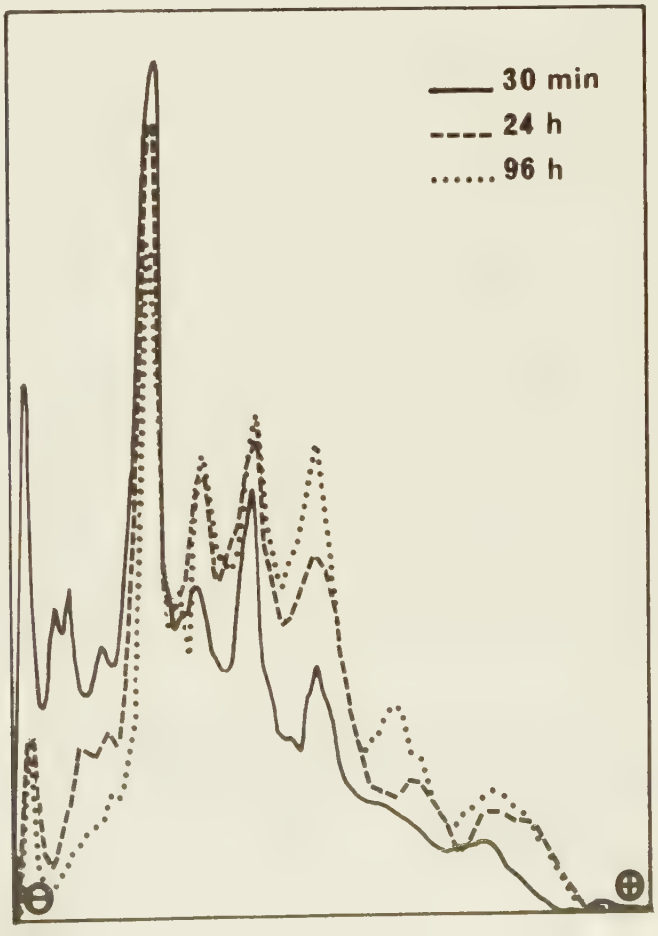
Les influences respectives des agents dissociant et réducteur sur l' α_2-MG sont contrôlées par des autoincubations d'échantillons d' α_2-MG et des incubations de la protéine avec seulement SDS ou mercaptoéthanol. L'augmentation des composants de poids moléculaires compris entre 50 000 et 150 000 au détriment de la sous-unité 190 000 est observée dans chaque cas.

5.4.4. INCUBATIONS DE L' α_2-MG AVEC 1 % SDS, 1 % β ME APRES TRAITEMENT 10 MIN A 100°C

Afin de vérifier si l'évolution des électrophorèses en fonction du temps d'incubation est due à la présence de protéases fixées à l' α_2-MG avant sa préparation, la protéine est avant incubation traitée 10 min à 100°C. Dans ces conditions, les diagrammes électrophorétiques ne sont pas significativement modifiés avec le temps d'incubation (Fig.**29**), au contraire des résultats obtenus pour les autres expériences.

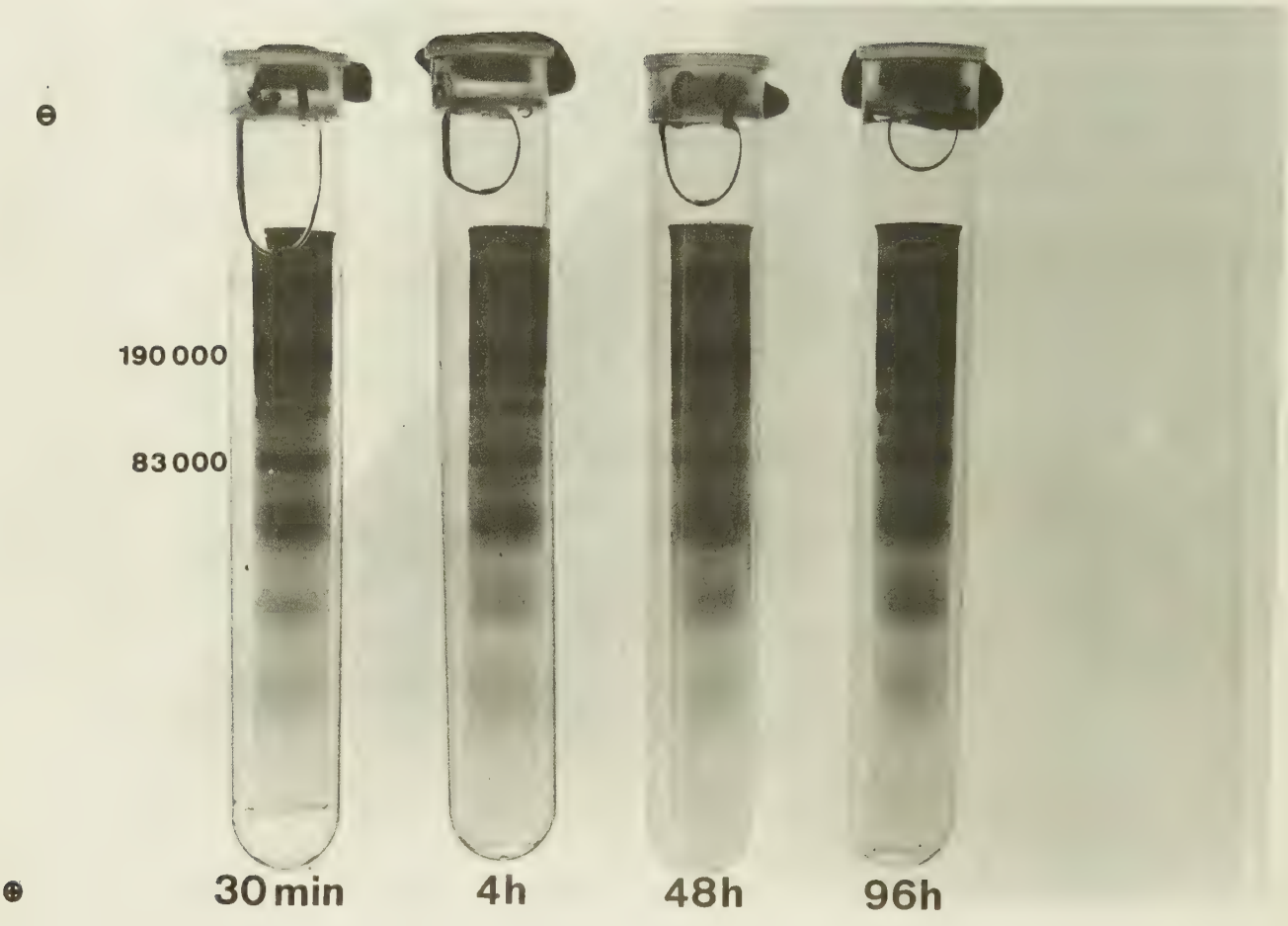
Fig. 28

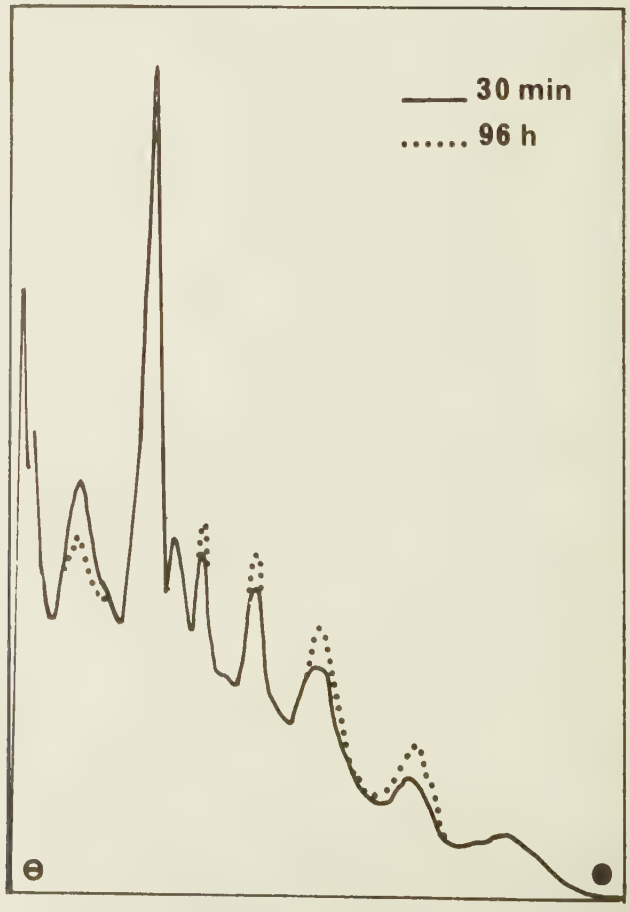




Electrophorèses en gel de polyacrylamide à 5% dans le SDS de l'α_2-MG incubée avec 1% SDS, 1% β-mercaptoéthanol pendant des temps variables.

Fig. 29





Electrophorèses en gel de polyacrylamide à 5% dans le SDS de l'α_2-MG incubée avec 1% SDS, 1% β-mercaptoéthanol pendant des temps variables, après traitement 10 min. à 100°C.

5.5 - DISCUSSION

Les expériences rapportées dans le dernier paragraphe (§ 5.4), et particulièrement le fait que le traitement 10 min à 100°C de l' α_2-MG empêche des changements consécutifs à de nouvelles incubations, montrent que des protéases sont liées in vivo à l' α_2-Macroglobuline humaine.

Une hydrolyse des liaisons peptidiques par le SDS peut être exclue car elle n'a jamais été rapportée dans la littérature (**219**) et dans la présente expérimentation, aucun changement n'est observé pour la transferrine et l'albumine après incubation dans les mêmes conditions que l' α_2-MG.

Si certaines protéases peuvent être actives en milieu très dénaturant comme le chlorhydrate de guanidine 6 M (**220**), la rétention de l'activité protéolytique dans des solutions contenant du dodécyl sulfate de sodium et un agent réducteur a été discutée (**169,187,221,222**) et récemment démontrée, dans une communication de PORTER et PRESTON, en ce qui concerne trypsine et chymotrypsine par l'étude des altérations des profils d'électrophorèse en gels de polyacrylamide dans le SDS(**219**).

Le problème des protéases associées à des protéines au cours de leur préparation et génant l'étude de leur structure sous-unitaire a été fréquemment rapporté tant pour des protéines sériques comme la ceruloplasmine (**210**) et les immunoglobulines (**223**) que pour la toxine diphtérique (**224**) ou la phosphofructokinase (**225**) et des oxydoréductases (**226**) de levure etc...

Le nombre de sous-unités de la thyroglobuline, protéine présentant des analogies avec l' α_2-MG a été très discuté: l'existence de quatre (**198**), six (**227**) et même huit (**200**) sous-unités était rapportée quand plusieurs composants différents n'étaient pas observés (**228**). AMBESI-IMPIOBATO et PITT-RIVERS (**229**) ont suggéré la liaison irréversible d'une enzyme protéolytique à la protéine au cours de sa préparation, responsable de clivages subséquents en présence ou non d'agents réducteurs. Des expériences similaires ont été effectuées par ROLLAND et LISSITZKY (**230**) sur la même protéine isolée de diverses espèces. En fait, il semble que ce problème était du aux conditions de conservation des glandes d'où la protéine était extraite, les lysozomes fragiles libérant des protéases et la thyroglobuline isolée dans des conditions "idéales" ne serait en fait constituée que de deux chaînes polypeptidiques de poids moléculaire 330 000 (**231**).

Il est démontré que les α_2-MG que nous avons préparées, y compris à partir de sérum frais, contiennent des protéases ; il est toutefois possible

d'affirmer que le taux de complexation de ces α_2-MG est faible car :

- beaucoup de précautions ont été prises au cours de la préparation, elle a été, en particulier, effectuée en présence d'inhibiteurs des protéases de la coagulation.

- la sous-unité 190 000 est de très loin le composant principal en gel SDS alors que si chaque molécule d' α_2-MG était complexée, elle n'apparaîtrait plus sous cette forme, car clivée enzymatiquement.

- en admettant que le pHi du complexe α_2-MG-protéase est de 6.0 comme très récemment affirmé (**232**), et supérieur à celui de 1' α_2-MG libre, le pHi, 5.30, de nos préparations confirme que 1'essentiel de 1' α_2-MG n'est pas complexé aux protéases.

La nature de ces protéases liées in vivo à 1' α_2-MG est encore inconnue. En effet, s'il a été montré qu'une fraction de 1' α_2-MG circulante peut être complexée par une enzyme "plasmin-like" (**233**), il est peu probable qu'il s'agisse ici de trypsine, de plasmine, de thrombine ou de kallikréine, ces enzymes clivant une liaison peptidique près du centre de la sous unité 190 000 de la protéine pour ne donner que des "sous-unités" 83 000 sans composants de poids moléculaire intermédiaire (**214**), alors que dans le présent travail, des composants de poids moléculaires compris entre 50 000 et 150 000 sont formés aux dépens des sous-unités 190 000.

La présence de ces protéases dans les préparations d' α_2-MG résout de nombreuses questions qui s'étaient posées au cours de la préparation de la protéine. Les multiples bandes observées en gel d'amidon dans l'urée (**103**) ne sont vraisemblablement que des produits de dégradation ; il en est probablement de même pour les "sous-unités" d' α_2-MG mises en évidence immunologiquement dans le sérum (**234**), les auteurs n'avaient pu d'ailleurs en préciser le poids moléculaire n'indiquant qu'un coefficient de sédimentation compris entre 5 et 10 S. La proposition d'une structure contenant 20 à 25 chaînes polypeptidiques pour 1' α_2-MG (**106**) doit être considérée de la même manière, basée sur la détermination des résidus N-terminaux, elle ne tenait pas compte du fait que le moindre clivage dans la chaîne peptidique augmentait le nombre de résidus ; c'est d'ailleurs pourquoi lors d'un réexamen de ces résultats, leur quantification s'est avérée très difficile et ce n'est qu'approximativement qu'il est possible d'avancer que avec des quantités pondérales égales de protéine, les résidus N-terminaux sont deux fois plus importants dans la fraction II, 83 000 - 85 000, que dans la protéine

entière. Le même problème s'est également posé pour la thyroglobuline, les résultats étant considérés comme ambigus car plusieurs aminoacides intervenaient en quantité non stoechiométrique dans un total de 4 résidus N-terminaux par mole de thyroglobuline (**140**).

Les divergences concernant le nombre de sous-unités, 4 ou 8, de l' α_2-macroglobuline humaine provenaient en fait des conditions de préparation différentes des α_2-MG. La dissociation de l' α_2-MG fraîchement préparée conduit à des sous-unités de poids moléculaire 190 000 (§ 5.2.1) alors que, préparée à partir du sérum vieilli, des sous-unités de poids moléculaire 83 000 sont obtenues (§ 4.2).

Un clivage protéolytique se produirait au cours du vieillissement. En effet, la réduction-alkylation de l' α_2-MG, fraîchement préparée, incubée avec une protéase, la trypsine, dans les conditions de formation du complexe protéase-inhibiteur, c'est à dire dans le rapport molaire 1:1, conduit à une fraction protéique de poids moléculaire 83 000 (§5.2.2).

Ces expériences sont confirmées par l'étude de la structure sous-unitaire des α_2-MG isoléesde liquides pleuraux (§ 5.3), ces protéines en contact avec les protéases sont très dégradées.

Les résultats présentés dans ce travail combinés à ceux précédemment publiés suggèrent la structure suivante pour l' α_2-macroglobuline humaine : la protéine de poids moléculaire 780 000 (17-19 S) serait constituée de deux demi-molécules 11-12 S, liées entre elles par des liaisons non covalentes. Chacune de ces demi-molécules comprend deux chaînes polypeptidiques de poids moléculaire 190 000 liées entre elles par des ponts disulfures ; ces chaînes polypeptidiques possèderaient une région de clivage préférentiel par les protéases qui libèrent des fractions de poids moléculaire 80 000 - 90 000 apparemment semblables.

Cette conclusion est en accord avec l'hypothèse proposée par BAUMSTARK (**53,235**) le premier, selon laquelle l' α_2-MG était pour l'élastase à la fois inhibiteur et substrat. BARRET et STARKEY (**48**) ont développé ce modèle en supposant qu'une seule enzyme se lierait à une molécule de protéine en en clivant une ou plusieurs liaisons ; l' α_2-MG se présenterait comme une trappe pour les protéases, la fixation de l'enzyme induisant un changement

conformationnel dans lequel la molécule fixée est prisonnière et devient inaccessible à des molécules de taille trop importante. Ceci pourrait d'ailleurs être un facteur de régulation d'activité sur les petits substrats (**236**).

Cette hypothèse est appuyée par le fait que l' α_2-MG ne peut fixer que des molécules de protéases actives (**237**) ou sinon avec une affinité beaucoup plus faible (**238**), et par les résultats de microscopie électroniqu Si les premières observations (**239,240**) attribuaient à la protéine la forme de la lettre de l'alphabet cyrillique Ж , l'étude des complexes que forment les α_2-MG animales avec la trypsine et la chymotrypsine a montré que complexées, les protéines deviennent plus compactes, les branches latérales de l'image de la protéine native s'épaississant et leur longueur pouvant passer d'environ 200 Å à 150 Å pour le complexe (**241**).

La coupure d'une liaison peptidique aspécifique de l'inhibiteur par la protéase pourrait sembler en contradiction avec les résultats et l'hypothèse proposés par OZAWA et LASKOWSKI (**242**) pour l'interaction protéase-inhibiteur, puisque pour les inhibiteurs de faible poids moléculaire la liaison peptidique clivée est très spécifique, arginine-alanine ou arginine-isoleucine le plus souvent. Mais une telle possibilité a déjà été exclue pour l'interaction α_2-MG protéase, l'hypothèse étant que la région spécifique de la chaine polypeptidique est particulièrement susceptible à l'attaque pour des raisons stériques et pourrait être une région non globulaire similaire à la "hinge region" des immunoglobulines. Cette hypothèse accompagnée d'un réarrangement après fixation de la protéase est aisément concevable, le rapport de relaxation, ρ_h/ρ_o, de l' α_2-MG indiquant (§ 3.1.4) qu'environ 10 % du volume de la protéine étaient composés de domaines bien structurés liés entre eux par des chaînes "random" qui seraient très susceptibles à l'attaque protéolytique.

CONCLUSION

L'action connue de l'α_2-Macroglobuline sur la fixation et l'inhibition des protéases, et son rôle biologique éventuel au niveau cellulaire confèrent à cette protéine une originalité certaine et en justifient l'étude.

Bien que l'α_2-MG soit une glycoprotéine, la microhétérogénéité la caractérisant était généralement attribuée à une liaison plus ou moins complète avec les protéases et non à ses constituants glucidiques. Quatre formes moléculaires ont été isolées par électrofocalisation et leur analyse a montré qu'elles différaient par leur composition en acide N-acétylneuraminique et en galactose, suggérant que la microhétérogénéité est due à une glycosylation plus ou moins complète de la protéine.

L'α_2-MG, dont la structure contient 40% de feuillet β-plissé et pratiquement pas d'α-hélice, est pour une macroprotéine remarquablement résistante aux variations de pH ; sa structure secondaire n'en est en effet pas modifiée de pH 2 à pH 10. Cette caractéristique rejoint celle des protéines dans lesquelles la structure en feuillet β-plissé est prédominante, elles sont très résistantes à la dénaturation par les agents chimiques et physiques.

L'α_2-MG est également très stable avec la température mais, observation peu courante, un réarrangement moléculaire, non une dénaturation, est observée au-delà de 55°C, avec même une augmentation du pourcentage de structure ordonnée β. La question se pose de savoir si ce phénomène est spécifique des protéines de structure secondaire riche en feuillet β-plissé puisqu'il a été retrouvé, en plus marqué, sur des protéines de Bence-Jones de type κ.

Le poids moléculaire de l'α_2-MG, déterminé par équilibre de sédimentation après 60 heures, est 780.000. Du même ordre de grandeur que les poids moléculaires précédemment déterminés pour cette protéine, il en diffère toutefois, en raison du volume partiel spécifique utilisé, mais peut-être surtout en raison des conditions expérimentales (temps d'atteinte de l'équilibre).

Un tel poids moléculaire laissait penser à la présence d'une structure sous-unitaire pour l'α_2-MG.

Deux demi-molécules (11-12S), liées par des liaisons non covalentes, sont mises en évidence par ultracentrifugation dans différents milieux dénaturants et en particulier en présence de chlorhydrate de guanidine 6M.

En fait, le nombre de sous-unités de l'α_2-MG est supérieur à deux, si cette protéine est soumise à la réduction-alkylation. Selon l'état de vieillissement du sérum, source de l'α_2-MG, ce nombre est estimé à 8 ou 4.

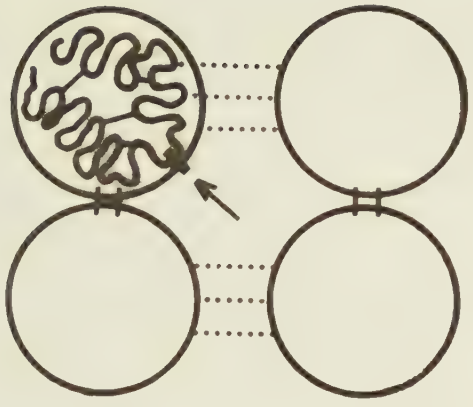
En effet, l'α_2-MG préparée à partir d'un pool de sérum conservé plusieurs semaines, donc vieilli, est transformée par le chlorhydrate de guanidine 6M après réduction-alkylation en une fraction polypeptidique de poids moléculair 83-85000, qui est isolée et caractérisée. Le poids moléculaire correspond au 1/8ème de celui de l'α_2-MG native. Au contraire, à partir d'un sérum fraichement prélevé, l'α_2-MG est dissociée dans les mêmes conditions en des chaînes polypeptidiques de poids moléculaire 190 000 correspondant au 1/4 de la molécule.

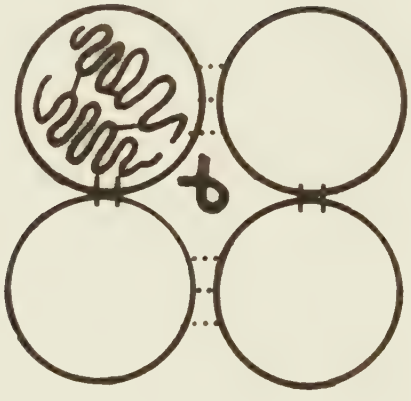
Cette différence est expliquée par la présence de protéases agissant en fonction du temps, dans les préparations d'α_2-MG. Ces protéases sont d'ailleu particulièrement résistantes à la dénaturation.

Les précédentes études sur la structure sous-unitaire éventuelle de l'α_2-MG restaient d'ordre analytique ; les résultats obtenus et les interprétations avancées étaient fondés seulement sur des observations du comporte ment de l'α_2-MG en électrophorèse en gel et en ultracentrifugation, en milieu dissociant. Les résultats du travail que nous avons entrepris sur ce sujet conduisent pour la première fois à l'isolement des sous-unités de l'α_2-Macroglobuline humaine et permettent de proposer un modèle de structure quaternaire de cette protéine :

L'α_2-Macroglobuline de poids moléculaire 780 000 (17-19 S) est constituée de deux demi-molécules 11-12 S, présentant une structure en feuillet β-plissé et pratiquement pas d'α-hélice, liées entre elles par des liaisons non covalentes. Chacune de ces demi-molécules comprend deux chaînes polypeptidique de poids moléculaire 190 000 liées entre elles par des ponts disulfures ; ces chaînes polypeptidiques possèdent une région de clivage préférentiel par les protéases qui libèrent des fractions de poids moléculaire voisin de 85 000, apparemment semblables.

Modèle de structure de l'α_2-Macroglobuline humaine





.... Liaisons non covalentes

— Liaisons disulfures

Protéase

← Région de clivage par les protéases

REFERENCES

REFERENCES

1. BOURRILLON, R.& RAZAFIMAHALEO, E. (1971) "Glycoproteins" ed. par GOTTSCHALK, A., Elsevier, Amsterdam, pp 699-716.

2. COHN, E.J., STRONG, L.E., HUGHES, W.L., MULFORD, D.L., ASWORTH, J.N., MELIN, M. & TAYLOR, H.L. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68, 459-475.

3. BROWN, R.K., BAKER, W.H., PETERKOFSKY, A. & KAUFFMAN, D.L. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 4244-4245.

4. PETERKOFSKY, A., LEVINE, L. & BROWN, R.K. (1956) J. Immunol. 76, 237-242.

5. MONTREUIL, J. (1957) Bull. Soc. Chim. Biol. 39 Suppl. III, 3-92.

6. SMITHIES, O. (1955) Biochem. J. 61, 629-641.

7. SCHULTZE, H.E., GÖLLNER, I., HEIDE, K., SCHÖNENBERGER, M. & SCHWICK, G. (1955) Z. Naturforsch. 10b, 463-473.

8. GANROT, P.O. & SCHERSTÉN, B. (1967) Clin. Chim. Acta 15, 113-120.

9. KLUTHE, R., KLEINE, N. & HAGEMANN, U. (1966) Experientia 22, 385-386.

10. GANROT, P.O., LAURELL, C.B. & OHLSSON, K. (1970) Acta Physiol. Scand. 79, 280-286.

11. BIETH, J., MIESCH, F. & MÉTAIS, P. (1969) Clin. Chim. Acta 24, 203-209.

12. SCHULLER, E., TÖMPE, L., LEFÈVRE, M. & MORENO, P. (1970) Clin. Chim. Acta 30, 73-82.

13. BIETH, J. & MÉTAIS, P. (1968) Clin. Chim. Acta 22, 639-642.

14. GOT, R. (1965) Clin. Chim. Acta 11, 432-441.

15. MROUEH, A.M. & ADHAM, N.F. (1970) Clin. Chim. Acta 28, 259-261.

16. HANEBERG, B. & TONDER, O. (1973) Scand. J. Immunol 2, 375-383.

17. NAGASAWA, S., SUGIHARA, H., HOON, B.H. & SUZUKI, T. (1970) J. Biochem. Tokyo 67, 809-820.

18. PEPPER, D.S. (1968) Biochim. Biophys. Acta 156, 327-339.

19. LAVERGNE, M. & RAYNAUD, M. (1970) Ann. Inst. Pasteur 119, 27-49.

20. DEMAILLE, J., DAUTREVAUX, M., HAVEZ, R. & BISERTE, G. (1965) Bull. Soc. Chim. France 12, 3506-3511.

21. JACQUOT-ARMAND, Y. & GUINAND, S. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133, 289-300.

22. HAVEZ, R., BONTE, M. & MOSCHETTO, Y. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 223-238.

23. PICARD, J.J., VANDEBROEK, G., HEREMANS, J.F. & DEFOSSE, G. (1966) Biochim. Biophys. Acta 117, 111-114.

24. GREENE, N.D., DAMIAN, R.T. & HUBBARD, W.J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 236, 659-663.

25. OHLSSON, K. (1971) Biochim. Biophys. Acta 236, 84-91.

26. PICARD, J.J. & HEREMANS, J.F. (1963) Biochim. Biophys. Acta 71, 554-561.

27. SCHARFMAN, A., HAYEM, A., MOSCHETTO, Y. & HAVEZ, R. (1970) C.R. Acad. Sci. Paris 271, 2412-1413.

28. BOFFA, G.A., JACQUOT-ARMAND, Y. & FINE, J.M. (1964) Biochim. Biophys. Acta 86, 511-518.

29. BEATON, G.H., SELBY, A.E., VEEN, M.J. & WRIGHT, A.M. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2005-2008.

30. HEIM, W.G. & LANE, P.H. (1964) Nature 203, 1182 - 1184.

31. WEIMER, H.E. & BENJAMIN, D.C. (1966) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122,1112-111

32. SCHEURLEN, P.G. (1968) Nature 217, 1267-1268.

33. SPIRO, R.G. (1970) Ann. Rev. Biochem. 39, 599-638.

34. BIRKE, G., LILJEDAHL, S.O. & NORBERG, R. (1969) Scand. J. Plast. Reconstr. Surgeon 3, 39-48.

35. SANDOR, G., ORLEY, C. & SANDOR, M. (1970) Ann. Biol. Clin. 28, 319-326.

36. JAMES, K., JOHNSON, G. & FUDENBERG, H.H. (1966) Clin. Chim. Acta 14, 207-214.

37. HEDFORS, E., KISTNER, S. & NORBERG, R. (1971) Acta Med. Scand. 190, 347-352.

38. SHERMAN, R.L. & BECKER, E.L. (1971) Nephron 8, 255-263.

39. MÜLLER, H., KLEINE, N., KAUFMANN, W. & KLUTHE, R. (1970) Klin. Woschen. 48, 1276-1281.

40. SONG, C.S., MERKATZ, I.R., RIFKIND, A.B., GILLETTE, P.N. & KAPPAS, A. (1970) Amer. J. Obstet. Gynecol. 108, 227-231.

41. HORNE, C.H.W., HOWIE, P.W., WEIR, R.J. & GOUDIE, R.B. (1970) Lancet 1, 49-50.

42. BARNETT, L.B., VERCELLOTTI, J.R., CRAGGLE, R. & DOHERTY, D.G. (1974) J. Dairy Sci. 57, 41-48

43. HADDEN, D.R. & PROUT, T.E. (1964) Nature 202, 1342-1343.

44. CLAUSEN J., GJEDDE, F. & JØRGENSEN, K. (1963) Proc. Soc. Exp. Biol. Med 112, 778-781.

45. ADHAM, N.F., CHAKMAKJIAN, Z.H., MEHL, J.W. & BETHUNE, J.E. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 132, 175-183.

46. HAVERBACK, B.J., DYCE, B., BUNDY, H.F., WIRTSCHAFTER, S.K. & EDMUNSON, H.A. (1962) J. Clin. Invest. 41, 972-980.

47. MEHL, J.W., O'CONNEL, W. & DE GROOT, J. (1964) Science 145, 821-822.

48. BARRET, A.J. & STARKEY, P.M. (1973) Biochem. J. 133, 709-724.

49. GANROT, P.O. (1967) Clin. Chim. Acta 16, 328-330.

50. LANCHANTIN, G.F., PLESSET, M.L., FRIEDMANN, J.A. & HART, D.W. (1966) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 444-449.

51. STEINBUCH, M. & BLATRIX, C. (1968) Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 13, 142-152.

52. HARPEL, P.C. (1970) J. Exp. Med. 132, 329-352.

53. BAUMSTARK, J.S. (1970) Biochim. Biophys. Acta 207, 318-330.

54. STARKEY, P.M. & BARRETT, A.J. (1973) Biochem. J. 131, 823-831.

55. EISEN, A.Z., BLOCH, K.J. & SAKAI, T. (1970) J. Lab. Clin. Med. 75, 258-263.

56. JAMES, K. TAYLOR, F.B. & FUDENBERG, H.H. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133, 374-376.

57. JACQUOT-ARMAND, Y. (1967) C.R. Acad. Sci. Paris 264, 2236-2239.

58. SUGIHARA, H., NAGASAWA. S. & SUZUKI, T. (1971) J. Biochem. Tokyo 70, 649-658.

59. SAUNDERS, R., DYCE, B.J., VANNIER, W.E. & HAVERBACK, B.J. (1971) J. Clin. Invest. 50, 2376-2383.

60. GENTOU, C., YON, J. & FILITTI-WURMSER, S. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 2003-2022.

61. GANROT, P.O. (1966) Acta Chem. Scand. 20, 2299-2300.

62. BERTHILLIER, G., GOT, R. & BERTAGNOLIO, G. (1968) Biochim. Biophys. Acta 170, 140-151.

63. BIETH, J., PICHOIR, M. & MÉTAIS, P. (1970) FEBS Lett. 8, 319-321.

64. NAGASAWA, S., HOON, B.H., SUGIHARA, H. & SUZUKI, T. (1970) J. Biochem. Tokyo 67, 821-832.

65. NAKAMURA, S., OGATA, H., TAKEO, K., KUWAHARA, A. & SUZUNO, R. (1975) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 356, 677-692.

66. MEYER, J.F., BIETH, J. & MÉTAIS, P. (1975) Clin. Chim. Acta 62, 43-54.

67. OHLSSON, K. (1971) Clin. Chim. Acta 32, 215-220.

68. OHLSSON, K., GANROT, P.O. & LAURELL, C. (1971) Acta Chir. Scand. 137, 113-121.

69. BLATRIX, C., ISRAEL, J., AUDRAN, R., DROUET, J., AMOUCH, P. & STEINBUCH, M. (1974) "Bayer Symposium V", Springer Verlag, Heidelberg, pp. 106-108.

70. DEBANNE, M.T., BELL, R. & DOLOVICH, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 411, 295-304.

71. VON ARDENNE, M. & CHAPLAIN, R.A. (1973) Experientia 29, 1271-1271.

72. APFFEL, C.A., PETERS, J.H. & WALKER, J.E. (1970) Boll. Ist. Sieroter. Milan 41, 434-447.

73. Mc CORMICK, J.N., NELSON, D., TUNSTALL, A.M. & JAMES, K. (1973) Nature New Biol. 246, 78-81.

74. CHASE, P.S. (1972) Cell. Immunol. 5, 544-554.

75. CALIO, N., CALIO, R. & ORSI, N. (1971) Boll. Ist. Sieroter. Milan 50, 66-73.

76. SHORTRIDGE, K.F. & LANSDELL, A. (1972) Microbios 6, 213-219.

77. KRZYWICKA, E., KLOPOTOWSKA, E., WASIK, M. & SKOPINSKA, E. (1971) Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 19, 707-713.

78. BERENBLUM, I., BURGER, M. & KNYSZYNSKI, A. (1968) Nature 217, 857-858.

79. SONTAG, J.M., TRAININ, N. & BERENBLUM, I. (1971) Radiat. Res. 45, 499-510

80. RAZAFIMAHALEO, E. & BOURRILLON, R. (1968) Biochim. Biophys. Acta 154, 397-404.

81. WALLENIUS, G., TRAUTMANN, R., KUNKEL, H.G. & FRANKLIN, E.C. (1957) J. Biol. Chem. 225, 253-267.

82. DEMAILLE, J., BROUSSAL, J., COLETTE, C., GUILLEUX, F. & MAGNAN de BORNIER, B. (1970) C.R. Acad. Sci. Paris 270, 2133-2136.

83. DUNN, J.T. & SPIRO, R.G. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5549-5555.

84. MULLER-EBERHARD, H.J., KUNKEL, H.G. & FRANKLIN, E.C. (1956) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 146-150.

85. HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H.& SCHULTZE,H.E.(1964)Clin. Chim. Acta 10, 293-307.

86. PARISI, A.F. & VALLEE, B.L. (1970) Biochemistry 9, 2421-2426.

87. NOMOTO, S., Mc NEELY, M.D. & SUNDERMAN Jr., F.W. (1971) Biochemistry 10, 1647-1651.

88. DUNN, J.T. & SPIRO, R.G. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5556-5563.

89. BOURRILLON, R., RAZAFIMAHALEO, E. & PARNAUDEAU, M.A. (1968) Biochim. Biophys. Acta 154, 405-407.

90. GANROT, P.O. & LAURELL, C.B. (1966) Clin. Chim. Acta 14, 137-138.

91. JAMES, K. (1965) Immunology 8, 55-61.

92. KNIGHT, K.L. & DRAY, S. (1968) Biochemistry 7, 1165-1171.

93. KNIGHT, K.L. & DRAY, S. (1968) Biochemistry 7, 3830-3835.

94. BERNE, B.H., DRAY, S. & KNIGHT, K.L. (1970) J. Immunol. 105, 856-864.

95. LEIKOLA, J., FUDENBERG, H., KASUKAWA, R. & MILGROM, F. (1972) Amer. J. Hum. Genet. 24, 134-144.

96. GALLANGO, M.L. & CASTILLO, O. (1974) J. Immunogenetics 1, 147-151.

97. SCHÖNENBERGER, M., SCHMIDTBERGER, R. & SCHULTZE, H.E. (1958) Z. Naturforsch. 13 b, 761-772.

98. JONES, J.M., CREETH, J.M. & KEKWICK, R.A. (1972) Biochem. J. 127, 187-197.

99. ROBERTS, R.C., RIESEN, W.A. & HALL, P.K. (1974) " Bayer Symposium V", Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 63-71.

100. GENTOU, C. (1968) "Protides of the Biological Fluids" ed. par PEETERS, H., Proc. 16th Colloquium-Bruges, pp. 255-263.

101. SCHULTZE, H.E., HAUPT, H., HEIDE, K., MÖSCHLIN, G., SCHMIDTBERGER, R. & SCHWICK, G. (1962) Z. Naturforsch. 17 b, 313-322.

102. ISLIKER, H. (1958) Helv. Med. Acta 25, 41-53.

103. POULIK, M.D. (1960) Biochim. Biophys. Acta 44, 390-393.

104. PICARD, J.J., ROELS, H.A., CARBONARA, A.O. & HEREMANS, J.F. (1964) "Protides of the Biological Fluids" ed. par PEETERS, H., Proc. 12th Colloquium-Bruges , pp. 353-362.

105. SCHULTZE, H.E. (1960) Verhandl. Deut. Ges. Inn. Med. 66, 225-227.

106. RAZAFIMAHALEO, E., FRÉNOY, J.P. & BOURRILLON, R. (1969) C.R. Acad. Sci. Paris 269, 1567-1569.

107. DEMAILLE, J. (1965) Thèse Doctorat en Médecine d'Etat, Lille.

108. SCHARFMAN, A., HAYEM, A. & HAVEZ, R. (1973) Biomedicine 18, 499-506.

109. FRÉNOY, J.P., RAZAFIMAHALEO, E. & BOURRILLON, R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 257, 111-121.

110. TSURU, D., TOMIMATSU, M., FUJIWARA, K. & KAWAHARA, K. (1975) J. Biochem. Tokyo 77, 1305-1312.

111. LEBRETON de VONNE, T. & MOURAY, H. (1974) Ann. Biol. Clin. 32, 185-196.

112. GOT, R., MOURAY, H. & MORETTI, J. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107, 278-285.

113. GAUTHIER, F., LENG, M. & MOURAY, H. (1974) C.R. Acad. Sci Paris 279, 1409-1412.

114. STEINBUCH, M. QUENTIN, M. & PEJAUDIER, L. (1965) Nature 205, 1227-1228.

115. RODBARD, D. & CHRAMBACH, A. (1971) Anal. Biochem 40, 95-134.

116. CORVOL, P., CHRAMBACH, A., RODBARD, D. & BARDIN, C.W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3435-3443.

117. CHRAMBACH, A., REISFELD, R.A., WYCKOFF, M. & ZACCARI, J. (1967) Anal. Biochem. 20, 150-154.

118. VESTERBERG, O. & SVENSSON, H. (1966) Acta Chem. Scand. 20, 820-834.

119. DOERR, P. & CHRAMBACH, A. (1971) Anal. Biochem. 42, 96-107.

120. RADOLA, B.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 412-428.

121. WEBER, K. & OSBORN, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

122. YPHANTIS, D.A. (1964) Biochemistry 3, 297-317.

123. FRÉNOY, J.P. & BOURRILLON, R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 371, 168-176.

124. COHN, E.J. & EDSALL, J.T. (1943) "Proteins, Aminoacids and peptides", Reinhold, New-York, pp. 370-381.

125. GIBBONS, R.A. (1971) "Glycoproteins" ed. par GOTTSCHALK, A., Elsevier, Amsterdam, pp. 31-140

126. WEBER, G. (1952) Biochem. J. 51, 145-155.

127. EDELHOCH, H. & STEINER, R.F. (1966) Biopolymers 4, 999-1014.

128. CHEN, R.F. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 128, 163-175.

129. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-276.

130. JAYLE, M.F. (1951) Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 876-880.

131. LUSTIG, B. & LANGER, A. (1931) Biochem Z. 242, 320-337.

132. WEIMER, H.E. & MOSHIN, J.R. (1953) Am. Rev. Tuberculosis 68, 594-602.

133. ELSON, L.A. & MORGAN, W.T. (1933) Biochem. J. 27, 1824-1828.

134. DISCHE, Z. (1930) Microkemie 8, 4-32.

135. WERNER, I. & ODIN, L. (1952) Acta. Soc. Med. Upsaliensis 57, 230-241.

136. WARREN, L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1971-1975.

137. DÉVÉNYI, T. (1968) Acta. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 3, 429-432.

138. CHAMBERS, R.E. & CLAMP, J.R. (1971) Biochem. J. 125, 1009-1018.

139. SANGER, F. (1945) Biochem. J. 39, 507-515.

140. SPIRO, M.J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5820-5826.

141. HARTLEY, B.S. (1970) Biochem. J. 119, 805-822.

142. BURGER, H.G., EDELHOCH, H. & CONDLIFFE, P.G. (1966) J. Biol. Chem. 241, 449-457.

143. HIRSCHFELD, J. (1960) Sci. Tools 7, 18-25.

144. OUCHTERLONY, O. (1949) Ark. Kemi. 26B 14 1-9.

145. GANROT, P.O. (1966) Clin. Chim. Acta 13, 597-601.

146. FRÉNOY, N., GOUSSAULT, Y. & BOURRILLON, R. (1971) Clin. Chim. Acta 32, 243-249.

147. FRÉNOY, J.P. (1969) Diplôme d'Etudes Approfondies, Paris.

148. FRÉNOY, J.P. (1971) Thèse Doctorat 3ème Cycle, Paris VII.

149. STEINBUCH, M., BLATRIX, C. & JOSSO, J. (1967) Nature 216, 500-501.

150. BURSTEIN, M. & MORFIN, R. (1969) Nouv. Rev. Franç. Hemat 9, 231-244.

151. MC CONNEL, D.J. & LOEB, J.N. (1974) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 891-896.

152. OWEN, J.A. (1967) Advan. Clin. Chem. 9, 1

153. GOT,R., CHEFTEL, R.I., FONT,J. & MORETTI,J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 136, 320-330.

154. SCHMID, K., BURKE, J.F., DEBRAY-SACHS, M. & TOKITA, K. (1964) Nature 204, 75-76.

155. VESTERBERG, O. (1969) Sci. Tools 16, 24-27.

156. GENTOU, C. (1968) C.R. Acad. Sci. Paris 266, 2358-2361.

157. HAMBERG, U., STELWAGEN, P. & ERVAST, H.S. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 439-451.

158. WILLIAMSON, A.R., SALAMAN, M.R. & KRETH, H.W. (1973) Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 210-224.

159. STEINBUCH, M. & AUDRAN, R. (1974) "Bayer Symposium V", Springer Verlag, Heidelberg, pp. 78-95.

160. BERG,K. & BEARN, A.G. (1966) J. Exp. Med. 123, 379-397.

161. GAUTHIER, F. (1974) Thèse Doctorat 3ème cycle, Poitiers.

162. ROSS, D.L. & JIRGENSONS, B. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2829-2836.

163. LITMAN, G.W., FROMMEL,D., ROSENBERG, A. & GOOD, R.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 236, 647-654.

164. Mc CUBBIN, W.D., OIKAWA, K. & KAY, C.M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun, 43, 666-674.

165. PÈRE, M., BOURRILLON, R. & JIRGENSONS, B. (1975) Biochim. Biophys. Acta 393, 31-36.

166. SHIMAZAKI, K., WALBORG, Jr., E.F., NERI, G. & JIRGENSONS, B. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 731-736.

167. TOWNEND, R., KUMOSINSKI, T.F. & TIMASHEFF, S.N. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4538-4545.

168. GREENFIELD, N. & FASMAN, G.D. (1969) Biochemistry 8, 4108-4115.

169. VISSER, L. & BLOUT, E.R. (1971) Biochemistry 10, 743-752.

170. SAXENA, I.P. & WETLAUFER, D.B. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 969-972.

171. CHEN, Y.H., YANG, J.T. & MARTINEZ, H.M. (1972) Biochemistry 11, 4120-4131.

172. CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. (1974) Biochemistry 13, 211-222.

173. LLOYD, K.O., BEYCHOK, S. & KABAT, E.A. (1968) Biochemistry 7, 3762-3765.

174. JACQUOT-ARMAND, Y. & KREBS, G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 303, 128-137.

175. EDELHOCH, H. & STEINER, R.F. (1964) "Electronic Aspects of Biochemistry" Academic Press Inc., New-York, pp. 7-22.

176. PICARD, J.J. & HEREMANS, J.F. (1968) "Protids of the Biological Fluids" ed. par PEETERS, H., Proc. 16th Colloquium-Bruges, pp. 247-254.

177. ANDREOLI, M., SENA, L., EDELHOCH, H. & SALVATORE, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 134, 242, 248.

178. CATHOU, R.E., KULCZYCKI Jr.,A. & HABER, E. (1968) Biochemistry 7, 3958-3964.

179. JEANLOZ, R.W. (1971) "Glycoproteins" ed. par GOTTSCHALK, A., Elsevier, Amsterdam, pp. 565-611.

180. VINCENT, J.P., CHICHEPORTICHE, R. & LADZUNSKI, M. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 401-411.

181. POLLET, R., ROSSI, G. & EDELHOCH, H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5921-5927.

182. STEINER, R.F. & EDELHOCH, H. (1963) Biochim. Biophys. Acta 66, 341-355.

183. UI, N., LIPPOLDT, R.E. & EDELHOCH, H. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 144, 202-209.

184. FISH, W.W., MANN, K.G. & TANFORD, C. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4989-4994.

185. DUCKWORTH, H.W. & SANWALL, B.D. (1972) Biochemistry 11, 3182-3188.

186. REYNOLDS, J.A. & TANFORD, C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5161-5165

187. NELSON, C.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3895-3901.

188. KAWAHARA, K., KIRSHNER, A.G. & TANFORD, C. (1965) Biochemistry 4, 1203-1213.

189. ERICKSON, R.P. (1970) Biochem. J. 120, 255-261.

190. BEZKOROVAINY, A., GROHLICH, D. & GERBECK, C.M. (1968) Biochem. J. 110, 765-770.

191. KIELLEY, W.W. & HARRINGTON, W.F. (1960) Biochim. Biophys. Acta 41, 401-421.

192. MARLER, E., NELSON, C.A. & TANFORD, C. (1963) Biochemistry 3, 279-284.

193. MUNK, P. & COX, D.J. (1972) Biochemistry 11, 687-697.

194. ULLMANN, A., GOLDBERG, M.E., PERRIN, D. & MONOD, J. (1968) Biochemistry 7, 261-265.

195. CASTELLINO, F.J. & BARKER, R. (1968) Biochemistry 7, 2207-2217.

196. LEE, J.C. & TIMASHEFF, S.N. (1974) Biochemistry 13, 257-265.

197. DONOVAN, J.W., MAPES, C.J., DAVIS, J.G. & HAMBURG, R.D. (1969) Biochemistry 8, 4190-4199.

198. DE COMBRUGGHE, B., PITT-RIVERS, R. & EDELHOCH, H. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2766-2773.

199. TANFORD, C. Communication personnelle.

200. LISSITZKY, S., ROLLAND, M., REYNAUD, J., SAVARY, J. & LASRY, S. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 464-471.

201. TANFORD, C., KAWAHARA, K. & LAPANJE, S. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89, 729-736.

202. FISH, W.W., REYNOLDS, J.A. & TANFORD, C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5166-5168.

203. BRYCE, C.F.A. & CRICHTON, R.R. (1971) J. Chromatogr. 63, 267-280.

204. WILLIAMS, J.G. & GRATZER, W.B. (1971) J. Chromatogr. 57, 121-125.

205. CHARLWOOD, P.A., PITT-RIVERS, R. & SCHWARTZ, H.L. (1970) Biochem. J. 116, 769-772.

206. MITCHELL, E.D., RIQUETTI, P., LORING, R.H. & CARAWAY, K.L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 314-322.

207. FLETCHER, A.P., NEUBERGER, A. & RATCLIFFE, W.A. (1970) Biochem. J. 120, 425-432.

208. DZIONARA, M., KALTSCHMIDT, E. & WITTMANN, H.G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 67, 1909-1913.

209. STEVENSON, F.K. & KENT, P.W. (1970) Biochem. J. 116, 791-796.

210. RYDÉN, L. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 380-386.

211. O'MALLEY, J.J. & WEAVER, J.L. (1972) Biochemistry 11, 3527-3532.

212. ULLRICH, J. & KEMPFLE, M. (1969) FEBS Lett. 4, 273-274.

213. SCHULTZE, H.E., HAUPT, H., HEIDE, K. & HEIMBURGER, N. (1963) Clin. Chim. Acta 8, 207-214.

214. HARPEL, P.C. (1973) J. Exp. Med. 138, 508-521.

215. WERB, Z. BURLEIGH, M.C., BARRET, A.J. & STARKEY, P.M. (1974) Biochem. J. 139, 359-368.

216. BIETH, J., BARTH, J.G. & MÉTAIS, P. (1970) Clin. Chim. Acta 30, 621-626.

217. SHTACHER, G., MAAYAN, R. & FEINSTEIN, G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 303, 138-147.

218. ABE, S. & NAGAI, Y. (1973) J. Biochem. Tokyo 73, 897-900.

219. PORTER, W.H. & PRESTON, J.L. (1975) Anal. Biochem. 66, 69-77.

220. FOSMIRE, G.J. & TIMASHEFF, S.N. (1972) Biochemistry 11, 2455-2460.

221. ROSSI, G.L. & BERNHARD, S.A. (1971) J. Mol. Biol. 55, 215-230.

222. GAUDIN, J.E. & VISWANATHA, T. (1972) Can. J. Biochem. 50, 392-398.

223. ROBERT, B. (1970) Progr. Immunobiol. Stand. 4, 13-16.

224. LECROISEY, A., BIZZINI, B., BLASS, J. & RAYNAUD, M. (1972) C.R. Acad. Sci. Paris 274, 2395-2397.

225. DIEZEL, W., BÖHME, H.J., NISSLER, K., FREYER, R., HEILMANN, W., KOPPERSCHLÄGER, G. & HOFMANN, E.E. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 479-488.

226. LABEYRIE, F. & BAUDRAS, A. (1972) Eur. J. Biochem. 25, 33-40.

227. PIERCE, J.G., RAWITCH, A.B., BROWN, D.M. & STANLEY, P.G. (1965) Biochim. Biophys. Acta 111, 247-257.

228. SPIRO, M.J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4446-4460.

229. AMBESI-IMPIOMBATO, F.S. & PITT-RIVERS, R. (1971) FEBS. Lett. 18, 73-75.

230. ROLLAND, M. & LISSITZKY, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 278, 316-336.

231. ROLLAND, M. & LISSITZKY, S. (1975) "Thyroïd meeting". Boston.

232. OHLSSON, K. & SKUDE, G. (1976) Clin. Chim. Acta 66, 1-7.

233. HARPEL, P.C. & MOSESSON, M.W. (1973) J. Clin. Invest. 52, 2175-2184.

234. VAN OSS, C.J. & BRONSON, P.M. (1972) Preparative Biochem. 2, 93-102.

235. BAUMSTARK, J.S. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 181-195.

236. RINDERKNECHT, H. & GEOKAS, M.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 295, 233-244.

237. STEINBUCH, M., BLATRIX, C., DROUET, J. & AMOUCH, P. (1972) Path. Biol. 20 Suppl., 52-55.

238. BIETH, J. Communication personnelle.

239. BLOTH, B., CHESEBRO, B. & SVEHAG, S.E. (1968) J. Exp. Med. 127, 749-756.

240. MORELIS, P., AMBROSIONI, J.C., GOT, R. & FONTANGES, R. (1969) C.R. Acad. Sci. Paris 269, 1453-1454.

241. GAUTHIER, F. & MOURAY, H. (1975) Int. J. Biochem. 6, 95-98.

242. OZAWA, K. & LASKOWSKI Jr., M. (1966) J. Biol. Chem 241, 3955-3961.

Index alphabétique des auteurs cités (avec indication de la référence bibliographique)

ABE, S. 218
ADHAM, N.F. 15, 45
AMBESI-IMPIOMBATO, F.S. 229
AMBROSIONI, J.C. 240
AMOUCH, P. 69, 237
ANDREOLI, M. 177
APFFEL, C.A. 72
ASWORTH, J.N. 2
AUDRAN, R. 69, 159

BAKER, W.H. 3
BARDIN, C.W. 116
BARKER, R. 195
BARNETT, L.B. 42
BARRETT, A.J. 48, 54, 215
BARTH, J.G. 216
BAUDRAS, A. 226
BAUMSTARK, J.S. 53, 235
BEARN, A.G. 160
BEATON, G.H. 29
BECKER, E.L. 38
BELL, R. 70
BENJAMIN, D.C. 31
BERENBLUM, I. 78, 79
BERG, K. 160
BERNE, B.H. 94
BERNHARD, S.A. 221
BERTAGNOLIO, G. 62
BERTHILLIER, G. 62
BETHUNE, J.E. 45
BEYCHOK, S. 173
BEZKOROVAINY, A. 190
BIETH, J. 11, 13, 63, 66 216, 238
BIRKE, G. 34
BISERTE, G. 20
BIZZINI, B. 224
BLASS, J. 224
BLATRIX, C. 51, 69, 149, 237
BLOCH, K.J. 55
BLOTH, B. 239
BLOUT, E.R. 169
BOFFA, G.A. 28
BÖHME, H.J. 225
BONTE, M. 22
BOURRILLON, R. 1, 80, 89, 106, 109 123, 146, 165
BRONSON, P.M. 234
BROUSSAL, J. 82
BROWN, D.M. 227
BROWN, R.K. 3, 4
BRYCE, C.F.A. 203
BUNDY, H.F. 46
BURGER, H.G. 142
BURGER, M. 78
BURKE, J.F. 154
BURLEIGH, M.C. 215
BURSTEIN, M. 150

CALIO, N. 75
CALIO, R. 75
CARAWAY, K.L. 206
CARBONARA, A.O. 104
CASTELLINO, F.J. 195
CASTILLO, O. 96
CATHOU, R.E. 178
CHAKMAKJIAN, Z.H. 45
CHAMBERS, R.E. 138

CHAPLAIN, R.A. 71
CHARLWOOD, P.A. 205
CHASE, P.S. 74
CHEFTEL, R.I. 153
CHEN, R.F. 128
CHEN, Y.H. 171
CHESEBRO, B. 239
CHICHEPORTICHE, R. 180
CHOU, P.Y. 172
CHRAMBACH, A. 115, 116, 117, 119
CLAMP, J.R. 138
CLAUSEN, J. 44
COHN, E.J. 2, 124
COLETTE, C. 82
CONDLIFFE, P.G. 142
CORVOL, P. 116
COX, D.J. 193
CRAGGLE, R. 42
CREETH, J.M. 98
CRICHTON, R.R. 203

DAMIAN, R.T. 24
DAUTREVAUX, M. 20
DAVIS, J.G. 197
DEBANNE, M.T. 70
DEBRAY-SACHS, M. 154
DE COMBRUGGHE, B. 198
DEFOSSE, G. 23
DE GROOT, J. 47
DEMAILLE, J. 20, 82, 107
DÉVÉNYI, T. 137
DIEZEL, W. 225
DISCHE, Z. 134
DOERR, P. 119
DOHERTY, D.G. 42
DOLOVICH, J. 70
DONOVAN, J.W. 197
DRAY, S. 92, 93, 94
DROUET, J. 69, 237
DUCKWORTH, H.W. 185
DUNN, J.T. 83, 88
DYCE, B.J. 46, 59
DZIONARA, M. 208

EDELHOCH, H. 127, 142, 175, 177, 181, 182, 183, 198
EDMUNSON, H.A. 46
EDSALL, J.T. 124
EISEN, A.Z. 55
ELSON, L.A. 133
ERICKSON, R.P. 189
ERVAST, H.S. 157

FARR, A.L. 129
FASMAN, G.D. 168, 172
FEINSTEIN, G. 217
FILITTI-WURMSER, S. 60
FINE, J.M. 28
FISH, W.W. 184, 202
FLETCHER, A.P. 207
FONT, J. 153
FONTANGES, R. 240
FOSMIRE, G.J. 220
FRANKLIN, E.C. 81, 84
FRÉNOY J.P. 106, 109, 123, 147, 148
FRÉNOY, N. 146
FREYER, R. 225
FRIEDMANN, J.A. 50
FROMMEL, D. 163
FUDENBERG, H.H. 36, 56, 95
FUJIWARA, K. 110

GALLANGO, M.L. 96
GANROT, P.O. 8, 10, 49, 61
68, 90, 145
GAUDIN, J.E. 222
GAUTHIER, F. 113, 161, 241
GENTOU, C. 60, 100, 156
GEOKAS, M.C. 236
GERBECK, C.M. 190
GIBBONS, R.A. 125
GILLETTE, P.N. 40
GJEDDE, F. 44
GOLDBERG, M.E. 194
GÖLLNER, I. 7
GOOD, R.A. 163
GOT, R. 14, 62, 112
153, 240
GOUDIE, R.B. 41
GOUSSAULT, Y. 146
GRATZER, W.B. 204
GREENE, N.D. 24
GREENFIELD, N. 168
GROHLICH, D. 190
GUILLEUX, F. 82
GUINAND, S. 21

HABER, E. 178
HADDEN, D.R. 43
HAGEMANN, U. 9
HALL, P.K. 99
HAMBERG, U. 157
HAMBURG, R.D. 197
HANEBERG, B. 16
HARPEL, P.C. 52, 214, 233
HARRINGTON, W.F. 191
HART, D.W. 50
HARTLEY, B.S. 141
HAUPT, H. 85, 101, 213
HAVERBACK, B.J. 46, 59
HAVEZ, R. 20, 22, 27, 108
HAYEM, A. 27, 108
HEDFORS, E. 37
HEIDE, K. 7, 85, 101, 213
HEILMANN, W. 225
HEIM, W.G. 30
HEIMBURGER, N. 85, 213
HEREMANS, J.F. 23, 26, 104
176
HIRSCHFELD, J. 143
HOFMANN, E.E. 225
HOON, B.H. 17, 64
HORNE, C.H.W. 41
HOWIE, P.W. 41
HUBBARD, W.J. 24
HUGHES, W.L. 2

ISRAEL, J. 69
ISLIKER, H. 102

JACQUOT-ARMAND, Y. 21, 28, 57
174
JAMES, K. 36, 56, 73, 91
JAYLE, M.F. 130
JEANLOZ, R.W. 179
JIRGENSONS, B. 162, 165, 166
JONES, J.M. 98
JØRGENSEN, K. 44
JOSSO, J. 149

KABAT, E.A. 173
KALTSCHMIDT, E. 28
KAPPAS, A. 40
KASUKAWA, R. 95
KAUFFMAN, D.L. 3
KAUFMANN, W. 39

KAWAHARA, K. 110, 188, 201
KAY, C.M. 164
KEKWICK, R.A. 98
KEMPFLE, M. 212
KENT, P.W. 209
KIELLEY, W.W. 191
KIRSHNER, A.G. 188
KISTNER, S. 37
KLEINE, N. 9, 39
KLOPOTOWSKA, E. 77
KLUTHE, R. 9, 39
KNIGHT, K.L. 92, 93, 94
KNYSZYNSKI, A. 78
KOPPERSCHLÄGER, G. 225
KREBS, G. 174
KRETH, H.W. 158
KRZYWICKA, E. 77
KULCZYCKI Jr., A. 178
KUMOSINSKI, T.F. 167
KUNKEL, H.G. 81, 84
KUWAHARA, A. 65

LABEYRIE, F. 226
LADZUNSKI, M. 180
LANCHANTIN, G.F. 50
LANSDELL, A. 76
LANE, P.H. 30
LANGER, A. 131
LAPANJE, S. 201
LASKOWSKI Jr., M. 242
LASRY, S. 200
LAURELL, C.B. 10, 68, 90
LAVERGNE, M. 19
LEBRETON de VONNE, T. 111
LECROISEY, A. 224
LEE, J.C. 196
LEFÈVRE, M. 12
LEIKOLA, J. 95
LENG, M. 113
LEVINE, L. 4
LILJEDAHL, S.O. 34
LIPPOLDT, R.E. 183
LISSITZKY, S. 200, 230, 231
LITMAN, G.W. 163
LLOYD, K.O. 173
LOEB, J.N. 151
LORING, R.H. 206
LOWRY, O.H. 129
LUSTIG, B. 131

MAPES, C.J. 197
MARLER, E. 192
Mc. CONNEL, D.J. 151
Mc CORMICK, J.N. 73
Mc CUBBIN, W.D. 164
Mc NEELY, M.D. 87
MAAYAN, R. 217
MAGNAN de BORNIER, B. 82
MANN, K.G. 184
MARTINEZ, H.M. 171
MEHL, J.W. 45, 47
MELIN, M. 2
MERKATZ, I.R. 40
MÉTAIS, P. 11, 13, 63
66, 216
MEYER, J.F. 66
MIESCH, F. 11
MILGROM, F. 95
MITCHELL, E.D. 206
MONOD, J. 194
MONTREUIL, J. 5
MORELIS, P. 240
MORETTI, J. 112, 153
MORENO, P. 12
MORFIN, R. 150
MORGAN, W.T. 133

MOSCHETTO, Y. 22, 27
MÖSCHLIN, G. 101
MOSESSON, M.W. 233
MOSHIN, J.R. 132
MOURAY, H. 111, 112
113, 241
MROUEH, A.M. 15
MULFORD, D.L. 2
MÜLLER, H. 39
MULLER-EBERHARD, H.J. 84
MUNK, P. 193

NAGAI, Y. 218
NAGASAWA, S. 17, 58, 64
NAKAMURA, S. 65
NELSON, D. 73
NELSON, C.A. 187, 192
NERI, G. 166
NEUBERGER, A. 207
NISSLER, K. 225
NOMOTO, S. 87
NORBERG, R. 34, 37

O'CONNEL, W. 47
ODIN, L. 135
OGATA, H. 65
OHLSSON, K. 10, 25, 67
68, 232
OIKAWA, K. 164
O'MALLEY, J.J. 211
ORLEY, C. 35
ORSI, N. 75
OSBORN, M. 121
OUCHTERLONY, O. 144
OWEN, J.A. 152
OZAWA, K. 242

PARNAUDEAU, M.A. 89
PARISI, A.F. 86
PEJAUDIER, L. 114
PEPPER, D.S. 18
PÈRE, M. 165
PERRIN, D. 194
PETERKOFSKY, A. 3, 4
PETERS, J.H. 72
PICARD, J.J. 23, 26
104, 176
PICHOIR, M. 63
PIERCE, J.G. 227
PITT-RIVERS, R. 198, 205, 229
PLESSET, M.L. 50
POLLET, R. 181
PORTER, W.H. 219
POULIK, M.D. 103
PRESTON, J.L. 219
PROUT, T.E. 43

QUENTIN, M. 114

RADOLA, B.J. 120
RANDALL, R.J. 129
RATCLIFFE, W.A. 207
RAWITCH, A.B. 227
RAYNAUD, M. 19, 224
RAZAFIMAHALEO, E. 1, 80, 89
106, 109
REISFELD, R.A. 117
REYNAUD, J. 200
REYNOLDS, J.A. 186, 202
RIESEN, W.A. 99
RIFKIND, A.B. 40
RINDERKNECHT, H. 236
RIQUETTI, P. 206

ROBERT, B. 223
ROBERTS, R.C. 99
RODBARD, D. 115, 116
ROELS, H.A. 104
ROLLAND, M. 200, 230, 231
ROSEBROUGH, N.J. 129
ROSENBERG, A. 163
ROSS, D.L. 162
ROSSI, G. 181
ROSSI, G.L. 221
RYDÉN, L. 210

SAKAI, T. 55
SALAMAN, M.R. 158
SALVATORE, G. 177
SANDOR, G. 35
SANDOR, M. 35
SANGER, F. 139
SANWALL, B.D. 185
SAUNDERS, R. 59
SAVARY, J. 200
SAXENA, I.P. 170
SCHARFMAN, A. 27, 108
SCHERSTÉN, B. 8
SCHEURLEN, P.G. 32
SCHMID, K. 154
SCHMIDTBERGER, R. 97, 101
SCHÖNENBERGER, M. 7, 97
SCHULLER, E. 12
SCHULTZE, H.E. 7, 85, 97
101, 105, 213
SCHWARTZ, H.L. 205
SCHWICK, G. 7, 101
SELBY, A.E. 29
SENA, L. 177
SHERMAN, R.L. 38
SHIMAZAKI, K. 166
SHORTRIDGE, K.F. 76
SHTACHER, G. 217
SKOPINSKA, E. 77
SKUDE, G. 232
SMITHIES, O. 6
SONG, C.S. 40
SONTAG, J.M. 79
SPIRO, M.J. 140, 228
SPIRO, R.G. 33, 83, 88
STANLEY, P.G. 227
STARKEY, P.M. 48, 54, 215
STEINBUCH, M. 51, 69, 114
149, 159, 237
STEINER, R.F. 127, 175, 182
STELWAGEN, P. 157
STEVENSON, F.K. 209
STRONG, L.E. 2
SUGIHARA, H. 17, 58, 64
SUNDERMAN Jr., F.W. 87
SUZUKI, T. 17, 58, 64
SUZUNO, R. 65
SVEHAG, S.E. 239
SVENSSON, H. 118

TAKEO, K. 65
TANFORD, C. 184, 186, 188, 192
199, 201, 202
TAYLOR, F.B. 56
TAYLOR, H.L. 2
TIMASHEFF, S.N. 167, 196, 220
TOKITA, K. 154
TOMIMATSU, M. 110
TÖMPE, L. 12
TONDER, O. 16
TOWNEND, R. 167
TRAININ, N. 79
TRAUTMANN, R. 81

TSURU, D. 110
TUNSTALL, A.M. 73

UI, N. 183
ULLMANN, A. 194
ULLRICH, J. 212

VALLEE, B.L. 86
VANDEBROEK, G. 23
VANNIER, W.E. 59, 91
VAN OSS, C.J. 234
VEEN, M.J. 29
VERCELLOTTI, J.R. 42
VESTERBERG, O. 118, 155
VINCENT, J.P. 180
VISSER, L. 169
VISWANATHA, T. 222
VON ARDENNE, M. 71

WALBORG, Jr., E.F. 166
WALKER, J.E. 72
WALLENIUS, G. 81
WARREN, L. 136
WASIK, M. 77
WEAVER, J.L. 211
WEBER, G. 126
WEBER, K. 121
WEIMER, H.E. 31, 132
WEIR, R.J. 41
WERB, Z. 215
WERNER, I. 135
WETLAUFER, D.B. 170
WILLIAMS, J.G. 204
WILLIAMSON, A.R. 158
WIRTSCHAFTER, S.K. 46
WITTMANN, H.G. 208

WRIGHT, A.M. 29
WYCKOFF, M. 117

YANG, J.T. 171
YON, J. 60
YPHANTIS, D.A. 122

ZACCARI, J. 117

RESUME

L'action connue de l'α_2-Macroglobuline sur les protéases et son rôle biologique éventuel au niveau cellulaire confèrent à cette protéine une originalité certaine et en justifient l'étude.

L'α_2-MG humaine a été préparée dans un état homogène aux différents critères de pureté (électrophorèse en gel, immunoélectrophorèse et ultracentrifugation). Une méthode de préparation originale d'α_2-MG individuelles a été proposée ; elle fait appel à la filtration sur gel d'agarose du sérum préalablement débarassé des lipoprotéines et de l'IgM. L'α_2-MG ainsi rapidement préparée se révèle homogène et son activité inhibitrice de la trypsine est intacte.

La microhétérogénéité de l'α_2-MG a été montrée par électrofocalisation. Quatre formes moléculaires ont été isolées et alors que leurs compositions en aminoacides ne diffèrent pas significativement, leurs constituants glucidiques présentent des différences en ce qui concerne l'acide N-acétyl neuraminique. Les résultats suggèrent que cette microhétérogénéité est due à une glycosylation plus ou moins complète de la protéine, ce qui est confirmé par électrofocalisation de l'α_2-macroglobuline traitée à la neuraminidase.

L'α_2-MG a été caractérisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et son poids moléculaire, déterminé par ultracentrifugation est 780 000. L'étude par dichroïsme circulaire a montré que la structure secondaire de la protéine ne contient pratiquement pas d'α-hélice et environ 40% de structure en feuillet β-plissé. La molécule protéique est très peu rigide comme montré par polarisation de fluorescence.

L'α_2-MG s'est révélée résistante aux variations de pH, sa structure secondaire n'est pas modifiée de pH 2 à pH 10 ; dichroïsme circulaire et fluorescence permettent d'observer des modifications dans le sens de la dénaturation au delà de pH 10.

La protéine est remarquablement stable avec la température, un réarrangement moléculaire, et non une dénaturation, est observé à partir de 55°C avec même une augmentation du pourcentage de structure ordonnée β.

Jusqu'à présent tous les résultats rapportés dans la littérature concernant la structure sous-unitaire de l'α_2-MG ne l'avaient été qu'à partir

Le poids moléculaire de l'α_2-MG, déterminé par équilibre de sédimentation après 60 heures, est 780.000. Il diffère sensiblement des poids moléculaires précédemment déterminés pour cette protéine en raison du

volume partiel spécifique utilisé et surtout des conditions expérimentales (temps d'atteinte de l'équilibre).

La dissociation de l'α_2-MG a été étudiée par ultracentrifugation, électrophorèse en gel et filtration en gel. Deux demi-molécules (11-12S), liées par des liaisons non covalentes, sont ainsi mises en évidence, particulièrement par ultracentrifugation en présence de chlorhydrate de guanidine 6M.

Le nombre des sous-unités de l'α_2-MG soumise à la réduction-alkylation est; selon l'état de vieillissement du sérum, source d'α_2-MG, estimé à 8 ou 4.

De l'α_2-MG préparée à partir d'un pool de sérum conservé plusieurs semaines, donc vieilli, il est possible d'isoler par réduction-alkylation suivie de gel-filtration, des fractions polypeptidiques de poids moléculaire 83.000-85.000; ces fractions correspondent au 1/8ème de la molécule native. Au contraire, l'α_2-MG préparée à partir d'un sérum fraîchement prélevé libère, par cette même technique, des chaînes polypeptidiques de poids moléculaire 190.000, 1/4 de la molécule.

Des protéases présentes dans les préparations d'α_2-MG expliquent cette différence, elles sont particulièrement résistantes à la dénaturation.

Jusqu'à présent les résultats rapportés dans la littérature concernant la structure sous-unitaire de l'α_2-MG ne l'avaient été qu'à partir de l'observation d'électrophorégrammes en gel d'amidon ou de polyacrylamide et de diagrammes d'ultracentrifugation, le présent travail rapporte les premiers isolement et caractérisation des sous-unités de l'α_2-MG humaine.

Les résultats permettent de proposer un modèle de structure de cette protéine : L'α_2-Macroglobuline de poids moléculaire 780.000 (17-19S) est constituée de deux demi-molécules 11-12S liées entre elles par des liaisons non covalentes. Chacune de ces demi-molécules comprend deux chaînes polypeptidiques de poids moléculaire 190.000 liées entre elles par des ponts disulfures; ces chaînes polypeptidiques possèdent une région de clivage préférentiel par les protéases qui libèrent des fractions de poids moléculaire voisin de 85.000 apparement semblables.

Colonne PORATH